



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología

**Efecto de la terapia fotodinámica en el tratamiento con  
ftalocianina de aluminio tetrasulfonada clorada  
(PcAlClS4) sobre amastigotes de *Leishmania*  
(*Leishmania*) *amazonensis* en *Mesocricetus auratus*  
(Hámster dorado)**

**TESIS**

Para optar el Título Profesional de Bióloga Microbióloga  
Parasitóloga

**AUTOR**

Carolina Medaly QUISPE SOTO

**ASESORES**

Mg. Jorge LEÓN QUISPE

Dr. Juan JIMÉNEZ CHUNGA

Lima, Perú

2019



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Quispe, C. (2019). *Efecto de la terapia fotodinámica en el tratamiento con ftalocianina de aluminio tetrasulfonada clorada (PcAlClS4) sobre amastigotes de Leishmania (Leishmania) amazonensis en Mesocricetus auratus (Hámster dorado)*. Tesis para el título profesional de Bióloga Microbióloga Parasitóloga. Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

---

## HOJA DE METADATOS COMPLEMENTARIOS

Código Orcid del autor (dato opcional):

Código Orcid del asesor o asesores (dato obligatorio): 0000-0001-5865-5374

DNI del autor: 47103508

Grupo de investigación: RECURSOS NATURALES Y BIOACTIVOS

Institución que financia parcial o totalmente la investigación:

PROGRAMA NACIONAL DE INNOVACIÓN PARA LA COMPETITIVIDAD Y PRODUCTIVIDAD – INNOVATE – PERÚ (Convenio N°177- PNICP-PIAP-2015) Y AL FONDO DE INVESTIGACIÓN DE TESIS DE VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN- UNMSM (RR N°06369 – R – 17)

Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación. Debe incluir localidades y coordenadas geográficas

LIMA

Año o rango de años que la investigación abarcó:

2017-2019



## Universidad Nacional Mayor de San Marcos

(Universidad del Perú, Decana de América)

### FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

#### ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGA MICROBIÓLOGA PARASITÓLOGA (MODALIDAD: SUSTENTACIÓN DE TESIS)

Siendo las 17:00 horas del 05 de diciembre de 2019, en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas y en presencia del jurado formado por los profesores que suscriben, se dio inicio a la sesión para optar al **Título Profesional de Bióloga Microbióloga Parasitóloga** de **CAROLINA MEDALY QUISPE SOTO**.

Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° 027-EPMP-2019, el titulando expuso su tesis: **"EFECTO DE LA TERAPIA FOTODINÁMICA EN EL TRATAMIENTO CON FTALOCIANINA DE ALUMINIO TETRASULFONADA CLORADA (PcAICIS<sub>4</sub>) SOBRE AMASTIGOTES DE *Leishmania (Leishmania) amazonensis* EN *Mesocricetus auratus* (HÁMSTER DORADO)"**, y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota 19..... calificativo: Aprobado con máximos honores.....

Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología, y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el **Título Profesional de Bióloga Microbióloga Parasitóloga** a **CAROLINA MEDALY QUISPE SOTO** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.

Siendo las 18:15 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 05 de diciembre de 2019.

Dr. JUAN JIMENEZ CHUNGA  
(PRESIDENTE)

Mg. JORGE LEON QUISPE  
(ASESOR)

Blga. LIDIA SÁNCHEZ PEREZ  
(MIEMBRO)

Blga. JEANNE ALBA LUNA  
(MIEMBRO)

## **DEDICATORIA**

A mis padres Paulina y Julio por apoyarme en todos los momentos más cruciales de mi vida y darme las fuerzas para seguir adelante y cumplir con mis metas propuestas.

A mi hermana Diana por aconsejarme y apoyarme en todo momento.

A mis abuelos Julia F., Virgilio S., Julia P. y Maximiliano Q. por su cariño y consejos.

A mi tío Rolando Q., quien en todo momento me dio su apoyo y consejos en mi etapa universitaria.

A toda mi familia en general, por su apoyo y aliento para seguir adelante.

Al Mg. Jorge León Quispe, quien me abrió las puertas del Laboratorio de Ecología Microbiana, me brindó su apoyo y amistad para la realización de esta tesis. Gracias por su confianza y enseñanzas.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Ecología Microbiana: Nadia, Astrid, Sarita, Melissa, Junior, Verónica, N. Rivas, N. Aguilar, Gaby, Jacky, Juan, Sheyla y Fanny, con quienes compartí muchos momentos de mi vida universitaria.

A mis amigos Jhoseline, Julia, Melissa, Joselyn, Jean Pierre, Karla, Laura, Christian, Raúl, Cristina, Jaqueline y Yohana, gracias por sus consejos y ánimos para seguir con mis objetivos.

## **AGRADECIMIENTO**

Al Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad - INNOVATE-PERU (Convenio N°177-PNICP-PIAP-2015) y al Fondo de Investigación de Tesis del Vicerrectorado de Investigación-UNMSM (RR N°06369-R-17) por el financiamiento de este trabajo de Tesis.

Al Mg. Jorge León Quispe, Coordinador General de Grupo de Investigación RECURSOS NATURALES Y BIOACTIVOS, quien me abrió las puertas del Laboratorio de Ecología Microbiana y me dio la oportunidad de participar en los proyectos de investigación a su cargo, fomentando en mi la investigación.

Al Dr. Julio Santiago por proporcionarme el fotosensibilizador y su amistad.

A la Blga. Nadia Galindo, quien me aconsejó en muchos momentos de la carrera.

A la Bach. Sara Tupa y la Bach. Verónica Rojas, quienes me apoyaron en los momentos más cruciales de este trabajo de tesis.

Al Dr. Juan Jiménez Chunga, quien me brindó asesoría para poder culminar exitosamente la tesis y su amistad.

Al Blgo. Raúl Yncente, por brindarme su ayuda cuando más lo necesité para culminar la tesis.

A la Blga. Gloria Minaya y al Blgo. Nyshon Rojas del Laboratorio de Referencia Nacional de Leishmaniasis del Instituto Nacional de Salud, por brindarme la cepa y sus asesorías en muchas dudas.

A mi segunda familia, mis compañeros del Laboratorio de Ecología Microbiana de la Facultad de Ciencias Biológicas, sin su ayuda no hubiese podido lograr mis objetivos.

A los miembros del Jurado de Tesis por su tiempo, apoyo y consejos para la culminación de esta tesis.

## ABREVIATURAS

**ERO:** Especies reactivas de oxígeno.

**FS:** Fotosensibilizador.

**GP:** Glicoproteína.

**GPLs:** Glicoinositolfosfolípidos libres.

**GPI:** Glicosilfosfadilinositol.

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** Peróxido de hidrógeno.

**H-E:** Hematoxilina - Eosina.

**LC:** Leishmaniasis cutánea.

**LCD:** Leishmaniasis cutánea difusa.

**LCL:** Leishmaniasis cutánea localizada.

**LMC:** Leishmaniasis mucocutánea.

**LV:** Leishmaniasis visceral.

**LED:** Light-emitting diode.

**nm:** Nanómetro.

**O<sub>2</sub>:** Oxígeno molecular.

**O<sub>2</sub><sup>-</sup>:** anión superóxido.

**<sup>1</sup>O<sub>2</sub>:** Oxígeno singlete.

**<sup>3</sup>O<sub>2</sub>:** Oxígeno triplete.

**-OH:** radical hidroxilo.

**OMS:** Organización Mundial de la Salud.

**PcAIS<sub>4</sub>Cl:** Ftalocianina de aluminio tetrasulfonada clorada.

**PcAlCl:** Ftalocianina de aluminio clorada.

**PBS:** Buffer fosfato salino.

**PCs:** Ftalocianinas.

**SSF:** Solución salina fisiológica.



**SBFi:** Suero bovino fetal inactivado.

**TFD:** Terapia fotodinámica.

**μl:** Microlitro.

**μm:** Micrómetro.

**UV/vis:** Ultravioleta / visible.

**λ:** Longitud de onda.

## ÍNDICE

	Página
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. MARCO TEÓRICO.....	4
2.1. LEISHMANIASIS .....	4
2.1.1. Generalidades .....	4
2.1.2. Epidemiología.....	6
2.2. LEISHMANIASIS CUTÁNEA (LC).....	8
2.2.1. Manifestaciones clínicas.....	8
2.3. MORFOLOGÍA DE <i>Leishmania</i> sp.....	12
2.3.1. Metaciclogénesis .....	13
2.4. CICLO BIOLÓGICO DE <i>Leishmania</i> sp. ....	15
2.5. TRATAMIENTOS GENERALES CONTRA LA LEISHMANIASIS CUTÁNEA Y MUCOCUTÁNEA.....	16
2.5.1. Tratamiento local.....	17
2.5.2. Tratamientos sistémicos .....	18
2.5.3. Tratamiento de leishmaniasis en el Perú.....	20
2.6. TERAPIA FOTODINÁMICA .....	20
2.6.1. Historia .....	20
2.6.2. Mecanismo de acción.....	21
III. HIPÓTESIS .....	30
IV. OBJETIVOS.....	30
4.1. OBJETIVO GENERAL .....	30

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
V. MATERIAL Y MÉTODOS.....	31
5.1. MATERIAL BIOLÓGICO .....	31
5.2. MATERIAL QUÍMICO .....	31
5.3. MÉTODOS .....	31
VI. RESULTADOS.....	36
VII. DISCUSIÓN.....	49
VIII. CONCLUSIONES .....	53
IX. RECOMENDACIONES .....	54
X. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA.....	55
ANEXO .....	64

<b>Figura 1.</b> Clasificación taxonómica de <i>Leishmania</i> spp.....	5
<b>Figura 2.</b> Hembra de <i>Lutzomyia</i> sp. ....	6
<b>Figura 3.</b> Distribución de casos de leishmaniasis cutánea y mucocutánea en el Perú entre los años 2000 al 2017. ....	7
<b>Figura 4.</b> Distribución de casos de leishmaniasis por departamentos del Perú.....	8
<b>Figura 5.</b> Leishmaniasis cutánea localizada(A), leishmaniasis cutánea difusa (B) y leishmaniasis mucocutánea (C).....	10
<b>Figura 6.</b> Estructura y organelos de promastigote y amastigote del género <i>Leishmania</i> spp. ....	12
<b>Figura 7.</b> Proceso de metacicloogénesis de <i>Leishmania</i> spp dentro del vector. ....	13
<b>Figura 8.</b> Diferencia entre las estructuras de las membranas plasmáticas del promastigote procíclico y promastigote metacíclico de <i>Leishmania</i> sp. ....	15
<b>Figura 9.</b> Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> sp. ....	16
<b>Figura 10.</b> Esquema de las reacciones de Tipo I y Tipo II.....	22
<b>Figura 11.</b> Estructura general de ftalocianina (Pc). M: ion metálico central (Al, Zn, Co, etc.) y R: posibles sustituyentes del anillo de benceno.....	26
<b>Figura 12.</b> Estructura química y espectro de absorción en la región UV/Vis de ftalocianina de aluminio tetrasulfonada clorada (PcAlClS <sub>4</sub> ). ....	27
<b>Figura 13.</b> Profundidad de penetración de la longitud de onda en los estratos de la piel. ....	28
<b>Figura 14.</b> Distribución de las diferentes longitudes de onda de una emisión de lámparas LEDs determinadas por distintos tonos de colores. ....	29
<b>Figura 15.</b> Inoculación de promastigotes metacíclicos de <i>L.(L.) amazonensis</i> en la zona sacro lumbar.....	33
<b>Figura 16.</b> Reposo después de haber sido aplicada la PcAlS <sub>4</sub> Cl en la base de la cola (derecha) y la aplicación de la TFD. ....	34

<b>Figura 17.</b> Gráfica de las medidas en mm del ejemplar tratado con PcAlCIS <sub>4</sub> crema durante 9 sesiones, sin cambios favorables. ....	37
<b>Figura 18.</b> Evolución de las úlceras luego del tratamiento con PcAlCIS <sub>4</sub> en crema e irradiado a 675.5 nm por 9 sesiones, con resultados desfavorables.....	37
<b>Figura 19.</b> Gráfica de las medidas en mm del primer ejemplar (A) durante 8 sesiones tratado con PcAlCIS <sub>4</sub> en solución. ....	38
<b>Figura 20.</b> Evolución favorable del primer ejemplar (A) de las zonas ulceradas por <i>L. amazonensis</i> , luego de la TFD por 8 sesiones. ....	39
<b>Figura 21.</b> Gráfica de las medidas en mm del segundo ejemplar (B) durante 12 sesiones tratado con PcAlCIS <sub>4</sub> en solución. ....	39
<b>Figura 22.</b> Evolución favorable del segundo ejemplar de hámster, las zonas ulceradas por <i>L. amazonensis</i> , luego de la TFD utilizando el fotosensibilizador PcAlCIS <sub>4</sub> e irradiados a 675.5 nm por 12 sesiones.....	40
<b>Figura 23.</b> Gráfica de las medidas en mm del tercer ejemplar durante las 21 sesiones. ....	41
<b>Figura 24.</b> Evolución favorable de las zonas ulceradas por <i>L. amazonensis</i> inducidas en el tercer ejemplar (C) luego de la TFD utilizando el fotosensibilizador PcAlCIS <sub>4</sub> e irradiados a 675.5 nm durante 21 sesiones. ....	42
<b>Figura 25.</b> Aspecto de lesiones del ejemplar del grupo 2 (C1) tratado solo con PcAlCIS <sub>4</sub> en solución sin irradiación. ....	43
<b>Figura 26.</b> Visualización de la induración y úlcera típica de leishmaniasis en el hámster dorado sin TFD luego de tres meses de inoculación. ....	44
<b>Figura 27.</b> Apariencia de las zonas evaluadas (sacro lumbar) del primer ejemplar (A), segundo ejemplar (B) y tercer ejemplar (C). ....	44
<b>Figura 28.</b> Observación de zonas no infectadas de un hámster dorado que se le aplicó la terapia fotodinámica (A) señalada con flechas rojas y de un hámster sano control (B). ....	45

<b>Figura 29.</b> Corte histológico de piel tratada, coloreado con H-E. Se observa en los círculos de color rojo amastigotes englobados en fagolisosomas y las flechas negras señalan las células plasmáticas. Aumento de 400X. ....	46
<b>Figura 30.</b> Corte histológico de la zona inflamada y coloreada con H-E. Se observa dentro de los círculos abundantes amastigotes y células plasmáticas señaladas por las flechas negras. Aumento de 400X.....	47
<b>Figura 31.</b> Corte histológico de piel (zona inflamada) y coloreada con H-E. Se observa macrófagos vacuolados con abundantes amastigotes de <i>L. (L.) amazonensis</i> en su interior. Aumento de 1000X.....	47
<b>Figura 32.</b> Corte histológico de piel sana, coloreado con H-E. Se observa el tejido epitelial y el tejido conectivo sin cambios morfológicos. Aumento de 100X. ....	48
<b>Figura 33.</b> Corte histológico de piel sana, coloreado con H-E. se observa el tejido conectivo sin alteraciones. Aumento a 400 X. ....	48

## ÍNDICE DE TABLAS

## Página

<b>Tabla 1.</b> Distribución de especies de <i>Leishmania sp.</i> .....	11
<b>Tabla 2.</b> Clasificación de los fotosensibilizadores por familias. ....	24
<b>Tabla 3.</b> Esquema general de grupos experimentales. ....	32
<b>Tabla 4.</b> Número de ejemplares de hámsteres que presentaron ulceración positiva a la inoculación de <i>L. (L.) amazonensis</i> para su tratamiento posterior con PcAlCIS <sub>4</sub> .....	36
<b>Tabla 5.</b> Medidas de las heridas y úlceras de la zona sacro lumbar con PcAlCIS <sub>4</sub> en crema e irradiadas a 675.5 nm. ....	66
<b>Tabla 6.</b> Medidas de las heridas y úlceras de la zona sacro lumbar del ejemplar A con PcAlCIS <sub>4</sub> en solución e irradiadas a 675.5 nm.....	66
<b>Tabla 7.</b> Medidas de las heridas y úlceras de la zona sacro lumbar del ejemplar B con PcAlCIS <sub>4</sub> en solución e irradiadas a 675.5 nm.....	67
<b>Tabla 8.</b> Medidas de las heridas y úlceras de la zona sacro lumbar del ejemplar C con PcAlCIS <sub>4</sub> e irradiadas a 675.5 nm.....	67

## RESUMEN

La leishmaniasis es una de las enfermedades tropicales denominadas “desatendidas”, que afecta a la población rural peruana y tiene como tratamiento de primera línea a los compuestos antimoniales pentavalentes. Estos compuestos generan efectos adversos como dolor en la zona de aplicación, vómitos, pancreatitis, toxicidad hepática, entre otros. La terapia fotodinámica (TFD), por ser un tratamiento novedoso ha sido planteado como alternativa al proceso convencional. El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto fotodinámico de ftalocianina de aluminio tetrasulfonada clorada ( $\text{PcAlClS}_4$ ) en el tratamiento de leishmaniasis cutánea inducida en *Mesocricetus auratus* (hámster dorado) con *Leishmania (L.) amazonensis*. Dos grupos de hámsteres de 6 semanas fueron inoculados intradérmicamente en la zona sacro lumbar con cultivos de promastigotes; estos fueron monitoreados hasta por 7 meses. Luego de 56 días de inoculación aparecieron lesiones características de la enfermedad, sobre las cuales se les aplicó  $\text{PcAlClS}_4$  tanto en crema como en solución; luego fueron irradiados de inmediato con una lámpara LED en campo oscuro. Después de 12 semanas pos-tratamiento se evidenció la disminución de la zona afectada, ocurriendo sólo con la aplicación en solución. Asimismo, se observó la diseminación (metástasis) del parásito hacia otras partes del organismo, esto se evidenció a través de cortes histológicos de los tejidos tratados y fueron coloreados con hematoxilina-eosina, permitiendo observar la presencia de células plasmáticas y amastigotes del parásito en todas las muestras analizadas. Los resultados obtenidos en la presente investigación permiten reformular propuestas alternativas en el uso de  $\text{PcAlClS}_4$  como TFD y sus limitaciones en el tratamiento de la leishmaniasis cutánea.

**Palabras clave:** Terapia fotodinámica, fotosensibilizador, Leishmaniasis cutánea, promastigote.

## ABSTRACT

Leishmaniasis is one of the tropical diseases called “neglected”, which affects the Peruvian rural population and has as a first-line treatment pentavalent antimonial compound. These compounds generate adverse effects such as pain in the area of application, vomiting, pancreatitis, liver toxicity, among others. Photodynamic therapy (PDT), being a novel treatment has been proposed as an alternative to the conventional process. The objective of this work was to determine the photodynamic effect of chlorinated tetrasulfonated aluminium phthalocyanine (PcAlClS<sub>4</sub>) in the treatment of induced cutaneous leishmaniasis in *Mesocricetus auratus* (golden hamster) with *Leishmania (L.) amazonensis*. Two groups of 6 weeks hamsters were inoculated intradermally in the lumbar sacral area with cultures of promastigotes; these were monitored for up to 7 months. After 56 days of inoculation, characteristic lesions of the disease appeared, on which PcAlClS<sub>4</sub> was applied both in cream and solution; these were immediately irradiated with a dark field LED lamp. After 12 weeks post-treatment the decrease of the affected area was evidenced, occurring only with the application in solution. Likewise, the dissemination (metastasis) of the parasite to other parts of the organism was observed, this was evidenced through histological sections of the treated tissues and they were colored with hematoxylin-eosin, allowing to observe the presence of plasma cells and amastigotes of the parasite in all the analyzed samples. The results obtained in the present investigation allow to formulate alternative proposals in the use of PcAlClS<sub>4</sub> as PDT and its limitations in the treatment of cutaneous leishmaniasis.

**Keywords:** Photodynamic therapy, photosensitizer, cutaneous leishmaniasis, promastigote.



## I. INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis es una enfermedad generada por protozoos del género *Leishmania* y transmitida por vectores de la familia Psychodidae; considerada como una de las enfermedades más desatendidas del mundo, ya que el riesgo de contraer es muy elevado (350 millones al año) y con una demanda de 1,5 a 2 millones de nuevos casos al año (Torres-Guerrero *et al.*, 2017).

En el Perú esta enfermedad se vio reflejada en los huacos antropomórficos provenientes de las culturas preincas Mochica y Chimú, donde se observa mutilaciones características de la nariz y del vestíbulo superior del labio. Se distribuye desde la vertiente occidental de los andes y valles interandinos entre los 1 200 a los 3 000 msnm y en la vertiente andina desde los 900 msnm donde se presenta dos formas clínicas: Leishmaniasis cutánea o UTA y leishmaniasis mucocutánea o espundia (Burstein y Guillén, 2002; Sánchez *et al.*, 2004). Generalmente esta enfermedad es tratada con antimoniales pentavalentes como Glucantime y Pentostam como primera línea de tratamiento (Henao *et al.*, 2004). También se puede utilizar otros medicamentos sistémicos de segunda opción como miltefosina, anfotericina B, sitamaquina y paramomicina (Singh *et al.*, 2012); no obstante, la utilización de dichos fármacos tiene numerosas desventajas asociadas a los tratamientos actuales, que promueven el abandono del tratamiento por los altos costos, duración del tratamiento, aparición de cepas resistentes al medicamento y efectos secundarios asociados a la toxicidad de los medicamentos utilizados para el tratamiento de esta enfermedad (Taylor *et al.*, 2011).

Todos estos factores han estimulado la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas que sean rápidas, seguras, de fácil administración y económicas; ya que en el Perú no se cuenta aún con un tratamiento efectivo contra la leishmaniasis cutánea (LC) y leishmaniasis mucocutánea (LMC), siendo actualmente un problema de salud pública

debido a su elevada incidencia y amplia distribución geográfica, afectando principalmente a personas de bajos recursos y con mayor dificultad de accesos a los servicios de salud (Pineda-Reyes *et al.*, 2015).

La terapia fotodinámica (TDF) es un procedimiento terapéutico que se utiliza en medicina, principalmente en dermatología, y su uso es aplicado en tratamientos de enfermedades oncológicas y dermatológicas como psoriasis, vitíligo, queratosis actínicas, rosácea etc. (Moreno *et al.*, 2007; Taylor *et al.*, 2011); y también en terapias antimicrobianas frente a patógenos como bacterias Gram positivas y Gram negativas, además de parásitos, hongos y virus (O’Riordan *et al.*, 2005). Este tratamiento emplea un agente fotosensibilizador (FS), luz y oxígeno molecular, que consiste en la destrucción selectiva de un tejido afectado al irradiar con una luz de longitud de onda conocida y en dosis adecuadas; para ello, el tejido debe haber sido preliminarmente fotosensibilizado, donde el oxígeno presente, induce la formación de radicales libres que causan necrosis celular selectiva (Cappugi *et al.*, 2001; Moreno *et al.*, 2007).

Los FS de la familia ftalocianina son compuestos coloreados de estructura macrocíclica, pertenecientes a la segunda generación de fotosensibilizadores. Uno de estos compuestos es la ftalocianina de aluminio tetrasulfonada clorada (PcAlClS<sub>4</sub>), cuya característica principal es su baja toxicidad y fácil penetración en el tejido (Amin *et al.*, 2012). Este compuesto se activa con la luz a una longitud de onda apropiada de 640 a 680 nm, es muy eficiente para producir especies reactivas de oxígeno (ERO); y en el caso de leishmaniasis ha mostrado actividad promisorio frente a diferentes especies de *Leishmania* sp. (Rueda *et al.*, 2018).

En pruebas realizadas en el tratamiento de leishmaniasis utilizando FS en modelos murinos como el hámster dorado (*Mesocricetus auratus*), tienen grandes ventajas por la similitud de las lesiones que produce la LC y LMC en humanos, siendo así estos animales altamente susceptibles a la infección con cepas de *Leishmania* sp.

(Hernandez, 2010; Robledo *et al.*, 2012; Peli *et al.*, 2011; Rojas-Jaimes y Iannacone, 2015).

El presente estudio tiene como objetivo central, evaluar el efecto de la terapia fotodinámica utilizando el fotosensibilizador ftalocianina de aluminio tetrasulfonada clorada (PcAlClS<sub>4</sub>) aplicado en un modelo animal como *Mesocricetus auratus* (hámster dorado), experimentalmente infectado con *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, como una posible terapia alternativa novedosa y de fácil acceso en el tratamiento de la LC.

## II. MARCO TEÓRICO

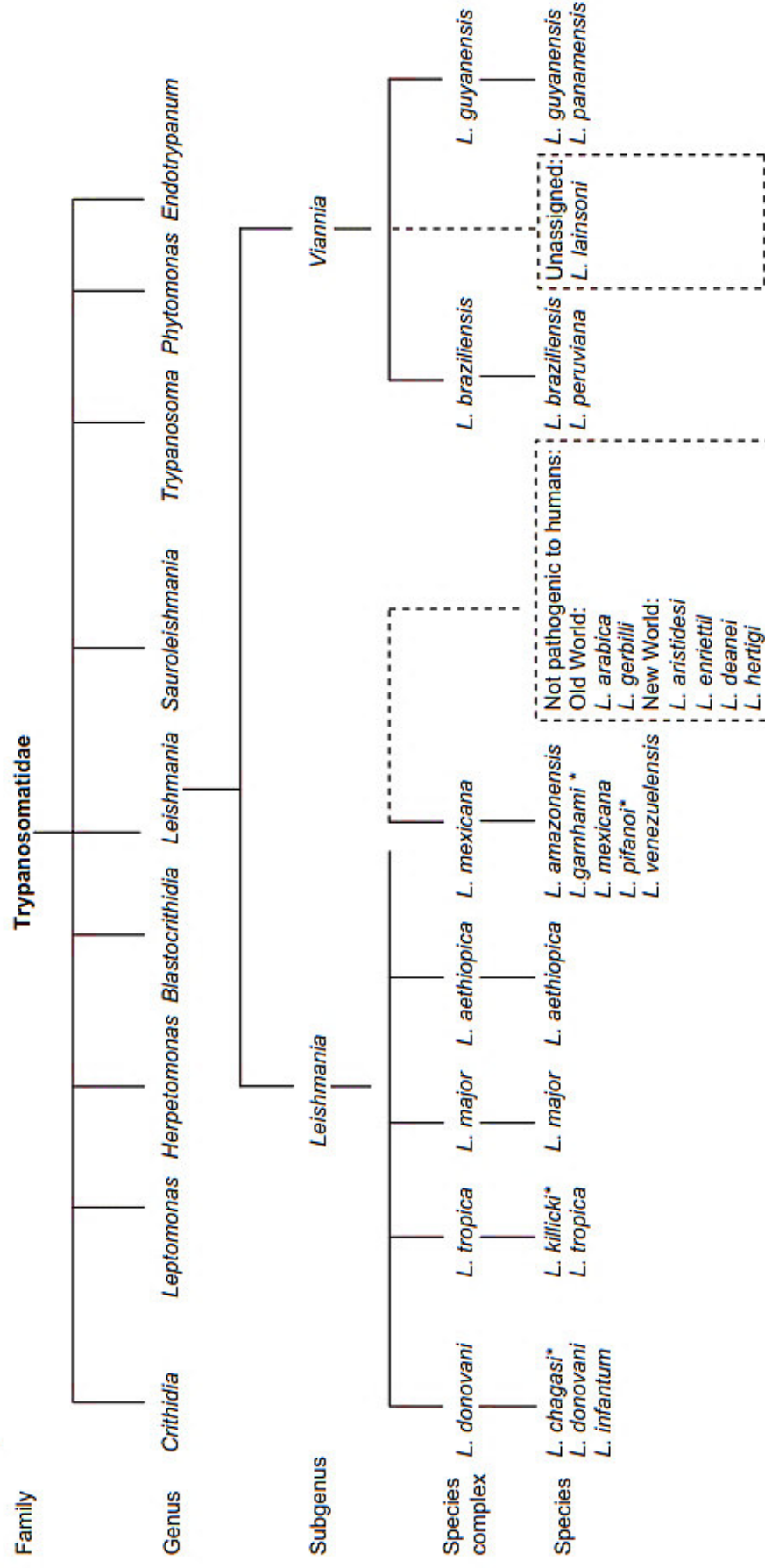
### 2.1. LEISHMANIASIS

#### 2.1.1. Generalidades

Esta enfermedad zoonótica es causada por protozoos intracelulares del género *Leishmania* y por diversas especies de los subgéneros *Leishmania* y *Viannia*, miembros de la familia Trypanosomatidae (Figura 1) (WHO, 2010). Son transmitidas por la picadura de insectos vectores conocidos como flebotominos o moscas de la arena de la familia Psychodidae, cuyas hembras hematófagas de los géneros *Phlebotomus* (en África, Asia y Europa - viejo mundo) y *Lutzomyia* (en América o nuevo mundo) transmiten a humanos y animales como caninos, roedores, marsupiales, etc. Se estima que son aproximadamente 700 especies de vectores entre estos dos géneros (Cañeda *et al.*, 2017).

En el Perú, se describen aproximadamente 190 especies de vectores del género *Lutzomyia*, entre ellos *Lu. (Lu.) peruensis*, *Lu. ayacuchensis*, *Lu. Verrucarum*, *Lu. pescei* y *Lu. tejadai* (distribuidos en los Valles Interandinos), y *Lu. chagasi*, *Lu. auraensis*, *Lu. yuilli yuilli* y *Lu. davis* (en la Amazonía). Según Cáceres (1996), estos vectores tienen diferentes nombres según la región donde se encuentren (titiras, manta blanca, lalapo, angelillos, plumillas, jenjen, rapache, capa blanca, wanwa, etc.); donde únicamente las hembras son hematófagas (antropofílica y zoofílica). Miden de 2 a 5 mm de largo y tanto las alas como la cabeza están cubiertas de una pilosidad fina y larga (Figura 2) (Cáceres, 1996; Zorrilla *et al.*, 2017).

## Taxonomy of *Leishmania*



\*Species status is under discussion. *L. chagasi* in the New World is the same species than *L. infantum*

**Figura 1.** Clasificación taxonómica de *Leishmania* spp.

(Fuente: World Health Organization, 2010).



**Figura 2.** Hembra de *Lutzomyia* sp.

(Fuente: Cañeda *et al.*, 2017).

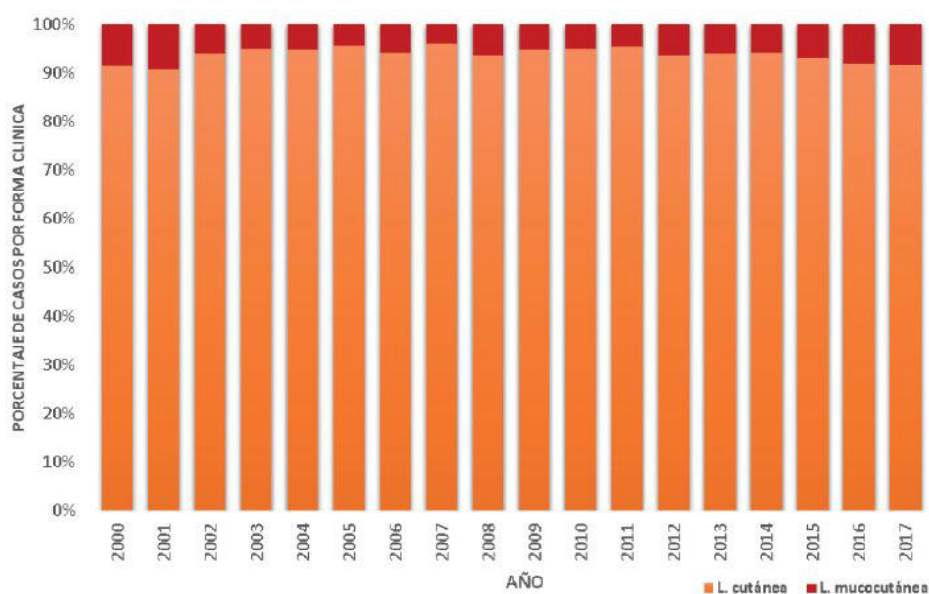
### **2.1.2. Epidemiología**

Esta enfermedad se desarrolla aproximadamente en 98 países, distribuida por la cuenca del Mediterráneo, Oriente Medio, Asia Central y las Américas; siendo los países como: Afganistán, Argelia, Brasil, Colombia, Etiopía, Irán, Nicaragua, Perú, Sudán y Siria donde presentan un mayor número de casos reportados entre un 70 y 75 % de incidencia global estimada (PAHO/WHO, 2017).

En las Américas, la leishmaniasis cutánea (LC) está presente en 20 países, con una incidencia estimada entre 600,000 y 1, 000,000 de casos al año, siendo endémica en 17 países como: Colombia, Costa Rica, Brasil, Argentina, Ecuador, Venezuela, Bolivia, Perú, Paraguay, El Salvador, Honduras, Nicaragua, Panamá, Guyana, Surinam, Guatemala y México con un total de 940,396 de nuevos casos reportados en el periodo de 2001 al 2017. En este último año los países que registraron un 72% de reportes fueron Brasil (17,526), Colombia (7,764), Perú (6,631) y Nicaragua (4,343), con una tasa de incidencia de 22,51 casos por 100,000 habitantes (WHO, 2019).

En el Perú los casos reportados en el periodo del 2000 al 2017 fueron de 129 321 casos, donde el 93,9% (121 617) de casos es de la forma cutánea y el 6,1% (7 774) de la forma mucocutánea (Figura 3); por lo general existe muy poca probabilidad (1 al 10%) que una persona desarrolle la forma mucocutánea con un periodo máximo de 1 a 5 años después de haberse curado de una leishmaniasis cutánea (Centro Nacional

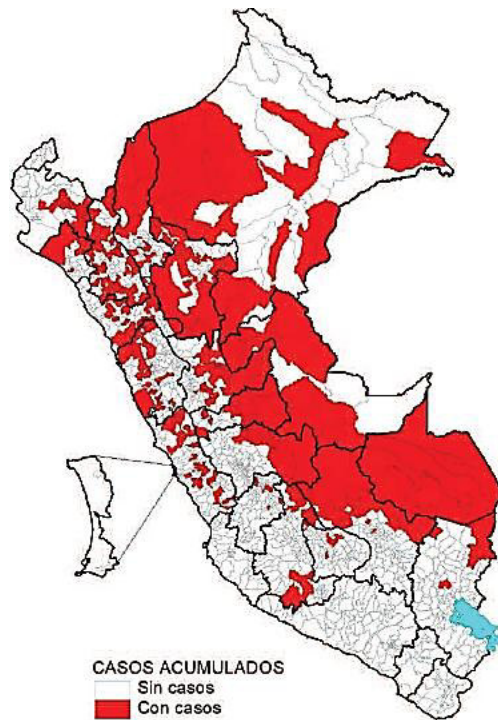
de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades y Ministerio de Salud, 2018).



**Figura 3.** Distribución de casos de leishmaniasis cutánea y mucocutánea en el Perú entre los años 2000 al 2017.

(Fuente: Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades y Ministerio de Salud, 2018).

En el año 2018 fueron reportados 2 502 casos de leishmaniosis con una tasa de incidencia acumulada de 7,81 casos por 100 mil habitantes. Así mismo, el 35,5% de estos casos fueron reportados en los departamentos de Piura, Cusco, Madre de Dios, Ancash y Cajamarca; siendo Madre de Dios y Cusco los que presentaron casi la mitad de todos los casos (Figura 4). Así mismo, la distribución por grupos de edad que pueden contraer la enfermedad es de un 36,13% (60 años a más) y de 20,34% (0-11 años). Hasta el mes de abril del 2019 fueron reportados 1337 casos y 1 defunción (Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades y Ministerio de Salud, 2019).



**Figura 4.** Distribución de casos de leishmaniasis por departamentos del Perú.

(Fuente: Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades y Ministerio de Salud, 2019).

## 2.2. LEISHMANIASIS CUTÁNEA (LC)

Es una enfermedad endémica de los trópicos y neotrópicos conocida también como leishmaniasis andina o UTA (Reithinger *et al.*, 2007). Se caracteriza por tener una o más lesiones en la piel con lesiones ulceradas y bordes elevados llamados induraciones; algunas veces suelen ser dolorosas solo si se infectan o al sobreponerse a una articulación (Kevric *et al.*, 2015).

### 2.2.1. Manifestaciones clínicas

Esta enfermedad presenta tres diferentes manifestaciones clínicas como:

#### **Leishmaniasis cutánea localizada (LCL)**

Caracterizada por presentar más de una lesión en cualquier parte del cuerpo que esté expuesta a la picadura del vector como las orejas, la nariz, los labios, las



mejillas, las manos, los antebrazos, las piernas, y los tobillos. La lesión inicia al formarse una pápula eritematosa, después de un determinado tiempo se convierte en una úlcera (seca o húmeda) con bordes elevados (induración) (Figura 5A), estas lesiones generalmente suelen ser indoloras a menos que se infecten (Rosal *et al.*, 2010; Khanna, 2016; Torres-Guerrero *et al.*, 2017).

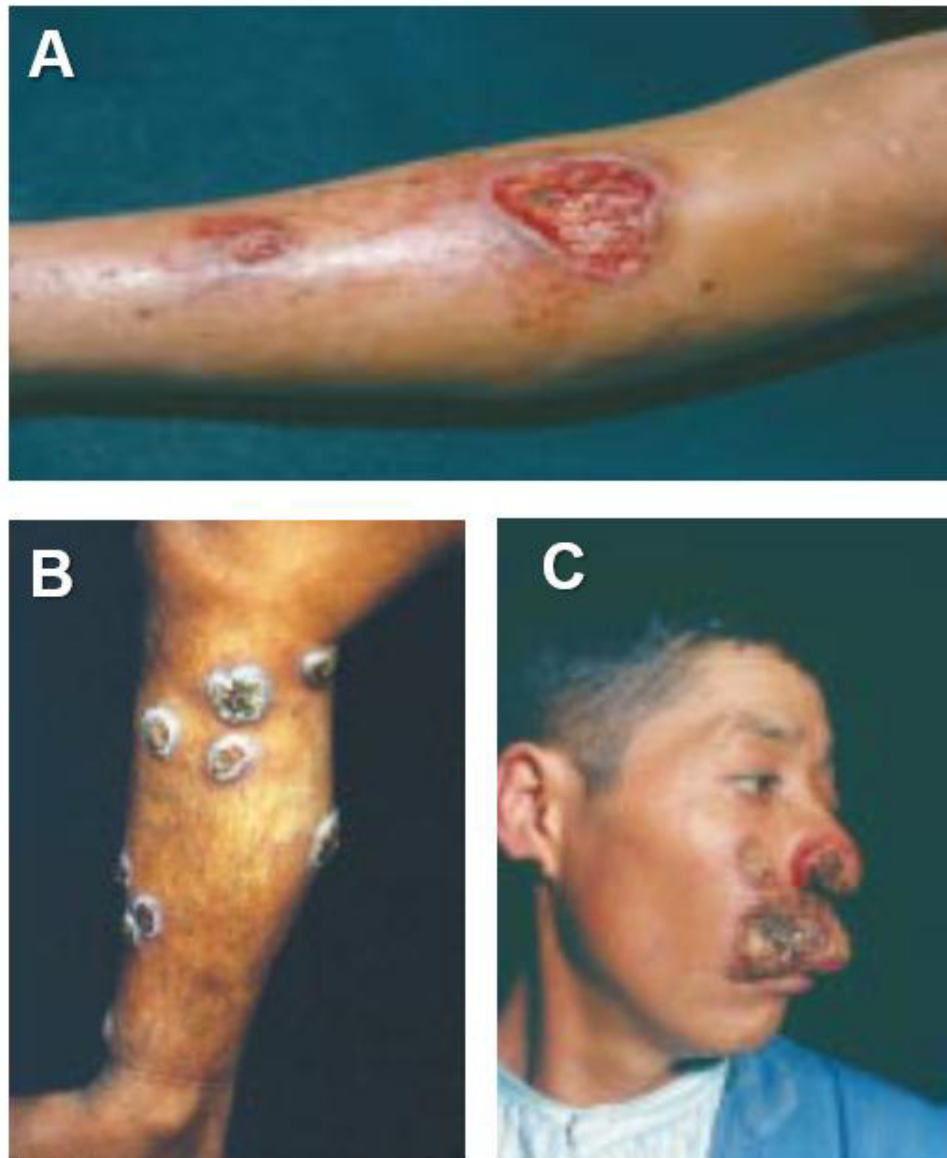
### **Leishmaniasis cutánea difusa (LCD)**

Conocida también como leishmaniasis anérgica o lepromatosa, es poco frecuente y desarrollada por baja o por la falta de respuesta inmune celular (antígeno del parásito). Generalmente es asintomática y rara vez presenta úlceras, por lo que se manifiesta como pápulas (lisas o verrugosas) o nódulos eritematosos de color marrón rojizo, diseminados frecuentemente en las extremidades, cara, glúteos y membranas de la mucosa; en algunas ocasiones suelen dañar grandes superficies de la piel (Figura 5B) (Rosal *et al.*, 2010; Kevric *et al.*, 2015; Khanna, 2016; Torres-Guerrero *et al.*, 2017).

### **Leishmaniasis mucocutánea (LMC)**

Conocida también como espundia, generalmente es producto de una secuela de la LC después de uno a más años de haber sanado. Frecuentemente inicia afectando la mucosa nasal con una excesiva secreción de moco, confundándose con un resfriado, luego se produce la inflamación de esta mucosa provocando un aumento de tamaño en la punta de la nariz conocida como “nariz de tapir”. Por lo general invade también las mucosas del paladar (blando y duro), faringe, laringe, tráquea, bronquios y el vestíbulo superior del labio (Figura 5C). Posteriormente suele producirse úlceras con un aspecto necrótico, doloroso y con desprendimiento, generando mutilaciones progresivas de las membranas mucosas ya mencionadas, lo cual afecta el estado general de la persona con respecto a su alimentación y respiración. En casos extremos si la enfermedad avanza y no se llega a tener un

tratamiento adecuado puede producir la muerte (Rosal *et al.*, 2010; Kevric *et al.*., 2015; Khanna, 2016; Torres-Guerrero *et al.*, 2017) .



**Figura 5.** Leishmaniasis cutánea localizada(A), leishmaniasis cutánea difusa (B) y leishmaniasis mucocutánea (C).

(Fuente: Burstein y Guillén, 2002).

Las diferentes manifestaciones clínicas son causados por diferentes tipos de especies de *Leishmania* del viejo y nuevo mundo (Tabla 1) a nivel mundial (Reithinger *et al.*, 2007).

**Tabla 1.** Distribución de especies de *Leishmania* sp.

ESPECIES DE <i>Leishmania</i> sp.	PATOLOGÍA	DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA
<b>NUEVO MUNDO</b>		
<i>L. (Viannia) braziliensis</i>	LCL, LMC	América del sur, parte de América central, México
<i>L. (Viannia) panamensis</i>	LCL, LMC	Norte de América del sur y sur de América central
<i>L. (Viannia) peruviana</i>	LCL	Perú
<i>L. (Viannia) guyanensis</i>	LCL	América del sur
<i>L. (Viannia) lainsoni</i>	LCL	América del sur
<i>L. (Viannia) colombiensis</i>	LCL	Norte de América del sur
<i>L. (Leishmania) amazonensis</i>	LCL, LCD	América del sur
<i>L. (Leishmania) mexicana</i>	LCL, LCD	América central, México, EE. UU.
<i>L. (Leishmania) pifanoi</i>	LCL	América del sur
<i>L. (Leishmania) venezuelensis</i>	LCL	Norte de América del sur
<i>L. (Leishmania) garnhami</i>	LCL	América del sur
<b>VIEJO MUNDO</b>		
<i>L. (Leishmania) aethiopica</i>	LCL, LCD	Ethiopia, Kenya
<i>L. (Leishmania) killicki</i>	LCL	África
<i>L. (Leishmania) major</i>	LCL	África, Asia
<i>L. (Leishmania) tropica</i>	LCL	África, Asia
<i>L. (Leishmania) donovani</i>	LCL, LV	África, Asia
<b>VIEJO Y NUEVO MUNDO</b>		
<i>L. (Leishmania) infantum</i>	LCL, LV	Europa, África y América del sur

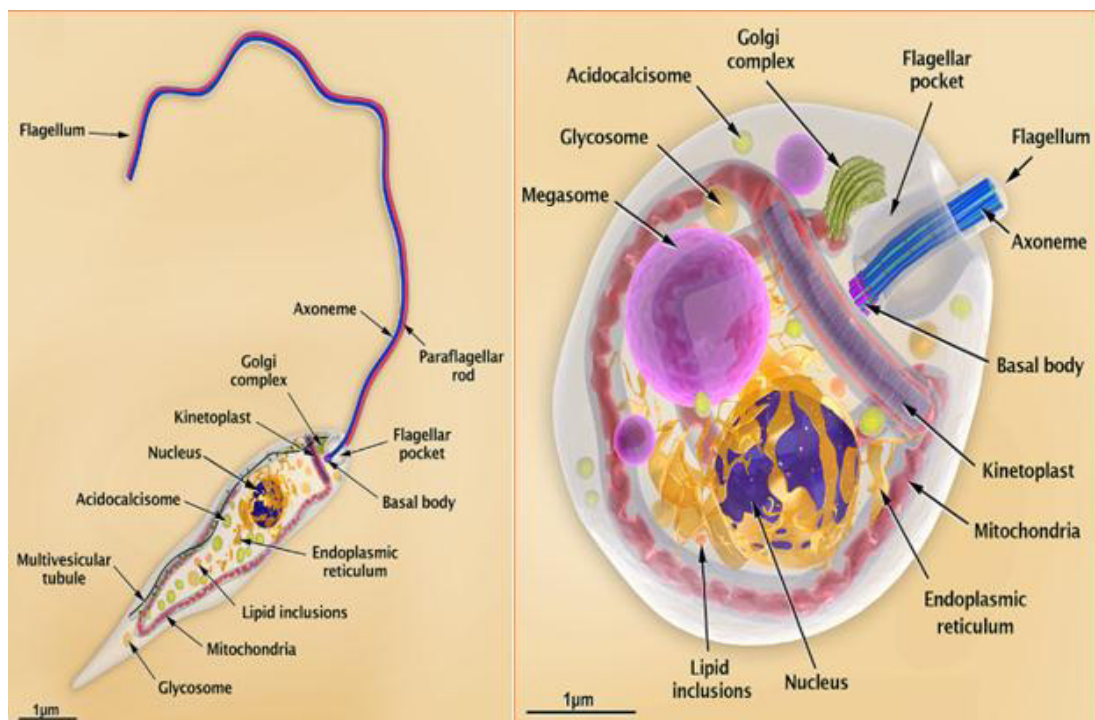
**LCL:** Leishmaniasis cutánea localizada; **LMC:** Leishmaniasis mucocutánea; **LCD:** Leishmaniasis cutánea difusa; **LV:** Leishmania visceral.

(Fuente: Reithinger *et al.*, 2007).

### 2.3. MORFOLOGÍA DE *Leishmania* sp.

El protozoo del género *Leishmania* presenta características que determinan la estructura celular como el núcleo, retículo endoplasmático, mitocondria, kinetoplasto, flagelo, bolsa flagelar (único sitio donde se realiza la endocitosis y exocitosis) etc. (Figura 6) (Teixeira *et al.*, 2013; Sunter y Gull, 2017). Este protozoo presenta dos formas fenotípicamente diferentes:

- El promastigote (de 10 a 15  $\mu\text{m}$  de longitud), es extracelular, móvil, flagelar y está presente en el tracto digestivo del vector.
- El amastigote (2,5 a 5,0  $\mu\text{m}$  de diámetro), es intracelular, inmóvil y redondeado, presente en el hospedero mamífero (Ponte-Sucre *et al.*, 2012; Rodríguez, 2015).

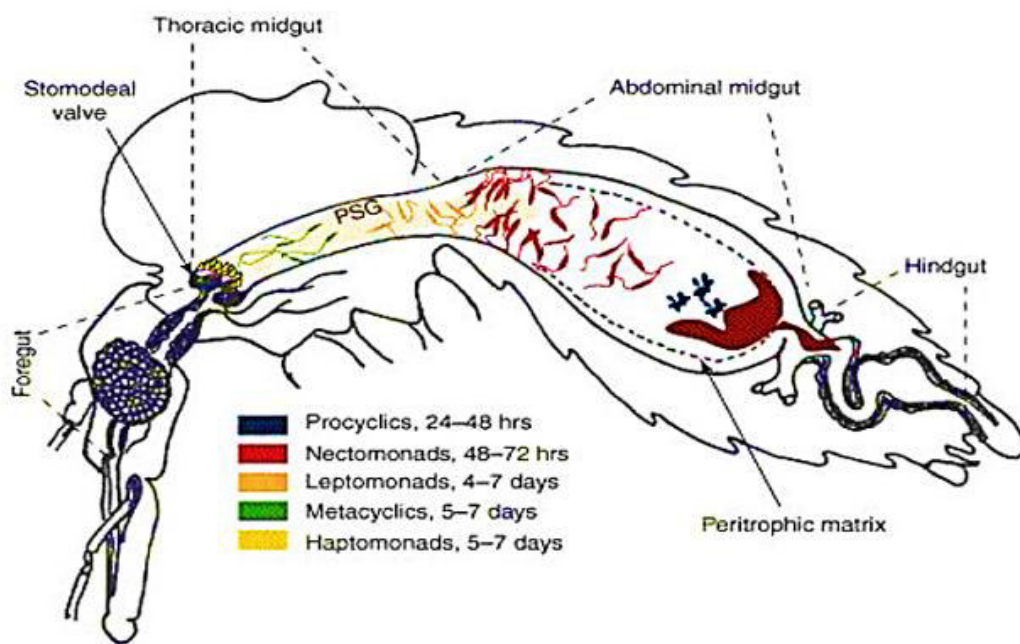


**Figura 6.** Estructura y organelos de promastigote y amastigote del género *Leishmania* spp.

(Fuente: Teixeira *et al.*, 2013).

### 2.3.1. Metaciclogénesis

Es un proceso complejo de diferenciación y multiplicación que se da por cambios morfológicos en el tracto digestivo del insecto vector. Este proceso inicia con la modificación de los amastigotes y posteriormente con la transformación de las diferentes formas de promastigotes no infectivos a promastigotes altamente infectivos; siendo importante el número de producción y ubicación de estos últimos para ser transmitidos con éxito. Se describen por lo menos cinco formas de desarrollo esencial para su propagación: promastigotes procíclicos, nectomónadas, leptomonadas, haptomónadas y metacíclicos (Figura 7). (Bates, 1994; Nieves y Rondón, 2010; Bates, 2018)

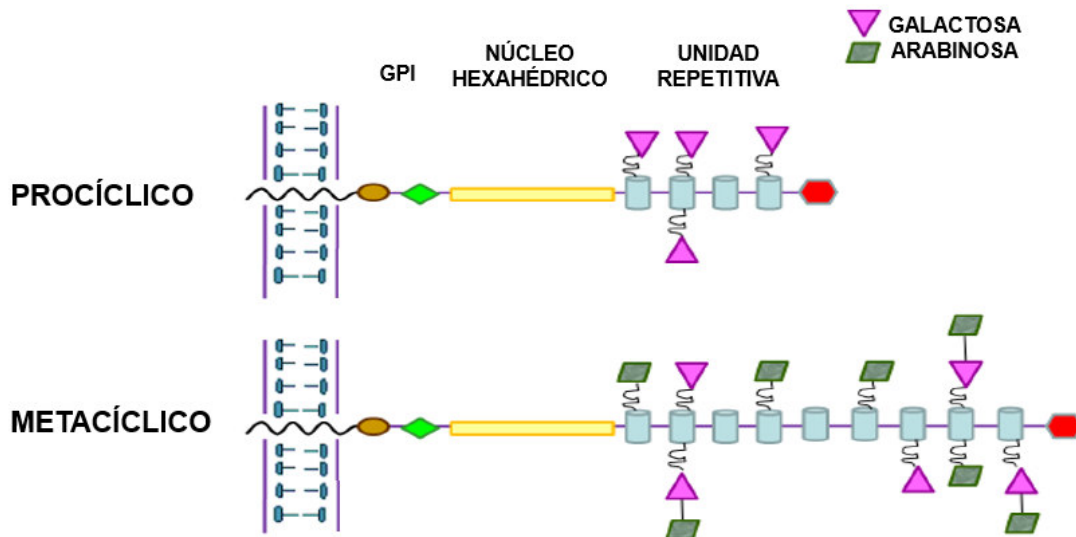


**Figura 7.** Proceso de metaciclogénesis de *Leishmania* spp dentro del vector.

(Fuente: Fernández, 2010).

Estos cambios morfológicos se deben a variaciones bioquímicas con la finalidad de ser altamente infectivos y aptos para resistir ataques del sistema inmune del

hospedero y del vector (Muskus y Marín-Villa, 2002). Este proceso de adaptación se evidencia en el exterior de la membrana plasmática compuesto por macromoléculas anclada a estructuras glicosilfosfatidilinositol (GPI) como: lipofosfoglicanos (LPG), glicoproteínas (GP63) y proteofosfoglicanos (PPG); también presenta una densa capa de glicoinositolfosfolípidos libres (GPLs) (Campos, 2008). El LPG se encuentra cubriendo toda la superficie del parásito (cuerpo y flagelo) y posee cuatro dominios como: un lípido de anclaje (1-O-aquil-2-alquilfosfatidilinositol), un núcleo hexacárido (glicanos), una unidad repetitiva fosforilada (tipo  $PO_4-6Galb_1-4Mana_1$ ) y un dominio terminal de oligosacáridos, constituido por disacáridos o trisacáridos. Este último compuesto experimenta cambios importantes del paso de promastigote procíclico a metacíclico duplicando la composición de sus azúcares como la arabinosa y galactosa (15 a 30 aproximadamente) (Figura 8), permitiendo la migración del intestino medio al posterior del vector (Spath y Beverley, 2001; Muskus y Marín-Villa, 2002; Fernández, 2010). La glicoproteína GP63 es una metaloproteasa de zinc de 63 KDa que también está distribuida en la superficie y tiene un rol fundamental como factor de virulencia (Isnard *et al.*, 2012; Olivier *et al.*, 2012). Los PPG son proteínas compuestas por un esqueleto polipeptídico que influye en la formación de la vacuola parasitófora en el macrófago. Los GPLs involucrados en la inhibición de óxido nítrico y también en la invasión al macrófago (Mukhopadhyay y Mandal, 2006; Lozano, 2011).

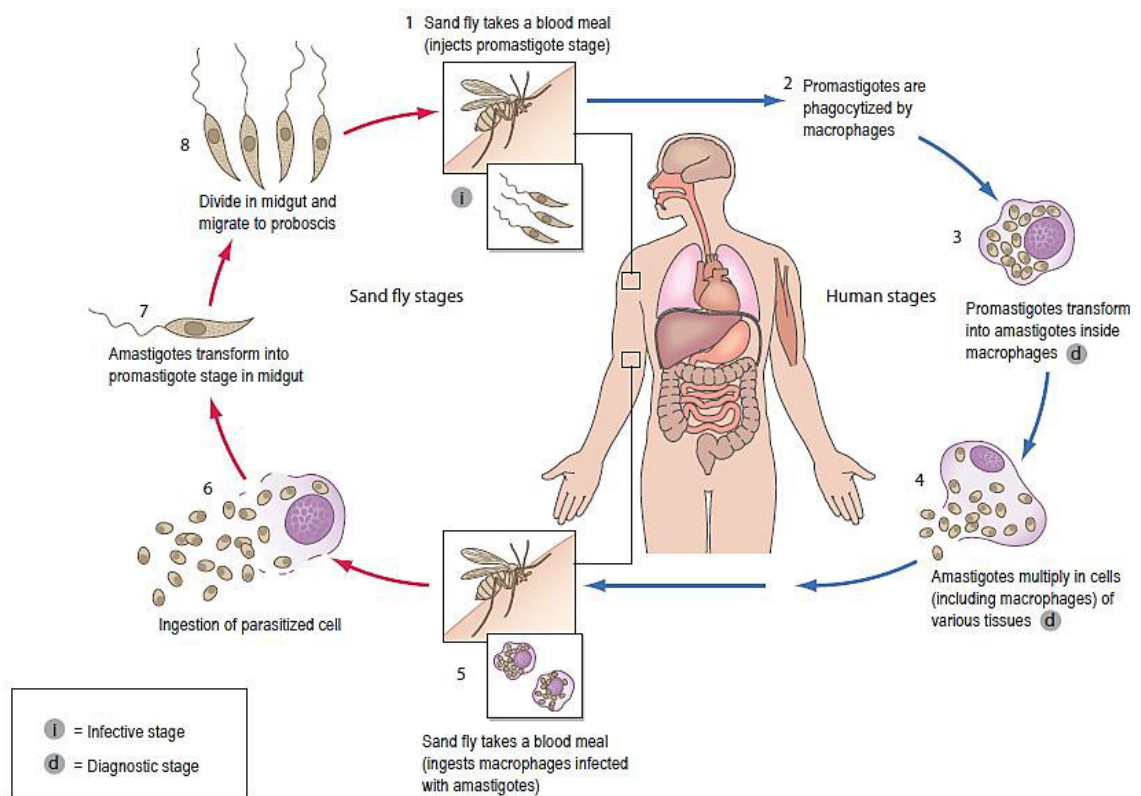


**Figura 8.** Diferencia entre las estructuras de las membranas plasmáticas del promastigote procíclico y promastigote metacíclico de *Leishmania sp.*

(Fuente: Fernández Rubio, 2010).

## 2.4. CICLO BIOLÓGICO DE *Leishmania sp.*

*Leishmania* tiene un ciclo de vida digenético; una etapa extracelular dentro del tubo digestivo del hospedero invertebrado (*Lutzomyia sp.*), donde se realiza la diferenciación de promastigotes procíclicos a metacíclicos (metaciclologénesis) y otra etapa intracelular en el hospedero mamífero. El ciclo inicia por la picadura del insecto infectado e inocular promastigotes metacíclicos de su probóscide en la piel, mientras ingiere sangre; posteriormente estos promastigotes son fagocitados y envueltos en una vacuola parasitófora (fagolisosoma) por macrófagos, neutrófilos o células dendríticas donde son transformados en amastigotes intracelulares (Kaye y Scott, 2011). Dentro de la vacuola parasitófora los amastigotes se multiplican por división simple e infectan otras células fagocíticas. El ciclo finaliza con la ingesta de estas células fagocíticas circulantes infectadas por otro flebótomo, en cuyo intestino se liberan amastigotes y se convierten en promastigotes iniciando la diferenciación hasta formar promastigotes altamente infectivos (Figura 10) (Ephros y Aronson, 2018).



**Figura 9.** Ciclo de vida de *Leishmania* sp.

(Fuente: Ephros y Aronson, 2018).

## 2.5. TRATAMIENTOS GENERALES CONTRA LA LEISHMANIASIS CUTÁNEA Y MUCOCUTÁNEA.

La selección de un tratamiento adecuado debe de ser individual ya que esta enfermedad depende de factores como las diferentes manifestaciones clínicas, tipos de especies de *Leishmania* y ubicación geográfica. Así mismo, existen compuestos que tienen actividad leishmanicida, pero tienen consecuencias en su uso como: alta toxicidad, resistencia de los mismos parásitos y ser costosos (Villa-Pulgarín, 2014; Moro, 2016; Aronson *et al.*, 2017).

Buckner y Schwartz (2017), consideran que se debe tener en cuenta tres aspectos para indicar un tratamiento local o sistémico:



1. Para enfermedades leves causadas por especies menos agresivas, la observación por si sola puede ser apropiada, especialmente cuando se considera la toxicidad potencial de los medicamentos.
2. El siguiente nivel involucra tratamiento local como ungüentos tópicos o inyecciones intralesionales con fármacos anti-leishmaniales.
3. Finalmente, se recomienda el tratamiento sistémico (oral o intravenoso), siempre y cuando la terapia local no es una opción o es inapropiada.  
(p.506)

### **2.5.1. Tratamiento local**

Este tratamiento se utiliza como primera elección para lesiones accesibles y pequeñas a través de la inyección de antimonios pentavalentes por vía parenteral (intramuscular o intravenosa) (Cobo, 2001).

#### **Antimonios pentavalentes (sbv)**

Estos compuestos fueron empleados por más de medio siglo como medicamentos de primera línea, del cual dos de sus derivados son los más empleados: estibogluconato de sodio y antimoniato de meglumina, con una dosis de 20 mg/Kg al día durante 20 a 28 días. Estos derivados son agentes químicamente similares y actúan inhibiendo la oxidación de los ácidos grasos y la formación de ATP. La toxicidad que produce se debe a su tiempo de vida, el estibogluconato de sodio tiene 2 horas y el antimoniato de meglumina tiene 33 horas por vía intravenosa y 76 horas por vía intramuscular luego de su administración y por lo general está acompañado de dolor local. La eliminación lenta produce una conversión a antimonio trivalente activo encargado de la toxicidad a largo plazo como náuseas, vómitos, mialgia, diarrea, erupciones

cutáneas, hepatotoxicidad, excreciones renales, pancreatitis y cardiotoxicidad (Frézard *et al.*, 2009; Kuhlmann y Fleckenstein, 2017; Ryan, 2018).

### **2.5.2. Tratamientos sistémicos**

Utilizado como una terapia alternativa cuando la terapia local fracasa y se originan infecciones en las mucosas con lesiones múltiples, grandes, diseminadas, desfigurantes y con el sistema inmunitario comprometido. Estos medicamentos son administrados por vía oral (miltefosina y azoles) y por vía parenteral (anfotericina, paramomicina y pentamidina) (Pérez, 2016; Ephros y Aronson, 2018).

#### **Miltefosina**

Utilizada en pacientes con leishmaniasis cutánea y mucocutánea de forma oral con una dosis de 2.5 mg/Kg al día durante 28 días (Ephros y Aronson, 2018) con un tiempo media de vida de 152 horas, el cual promueve su acumulación e induce resistencia y efectos secundarios como náuseas, vómitos, trastornos gastrointestinales y aumento de la creatinina (Singh *et al.*, 2012; Ryan, 2018).

#### **Azoles**

Son antifúngicos administrados por vía oral que poseen actividad leishmanicida con una eficiencia limitada, los más utilizados son fluconazol y ketoconazol con una dosis de 400-600 mg por 6 semanas y 600 mg por 4 semanas, respectivamente (Buckner y Schwartz, 2017). Ambos tienen una larga vida media y actúan a nivel del retículo endoplasmático del parásito inhibiendo la síntesis del ergosterol. La resistencia se da a través de la captura del esterol(colesterol) de los macrófagos, bajando la efectividad del producto y produciendo efectos secundarios a nivel del corazón, hígado, riñón y páncreas (Alrajhi *et al.*, 2002; López *et al.*, 2016).

### **Anfotericina B**

Es un agente antifúngico, extraído de *streptomyces nodosus*, utilizado como tratamiento de segunda línea. Se administra por vía intravenosa (IV) con una dosis de 20 mg/Kg al día durante 20 a 28 días. Este fármaco se une selectivamente a los esteroides (ergosterol) de la pared celular del parásito formando canales, lo cual provoca la pérdida del líquido intracelular del amastigote. Lo perjudicial de este fármaco es que son caros y provoca efectos como fiebre, resfriado, escalofríos, dolor óseo y a largo plazo nefrotoxicidad o paro cardíaco (Singh y Sivakumar, 2004; Moro, 2016).

### **Paromomicina**

Es un antibiótico aminoglucósido, utilizado como tratamiento de segunda línea, generalmente se utiliza la formulación tópica combinada entre paromomicina y gentamicina (15% y 0,5% respectivamente) con una aplicación de 10 a 20 días. Su efectividad depende de la especie de *leishmania*, inhibiendo la síntesis de proteínas. Es accesible económicamente, pero tiene efectos desfavorables con su uso como inflamaciones en las zonas ulcerosas (Pérez, 2016; Kuhlmann y Fleckenstein, 2017).

### **Pentamidina**

Es empleado para tratamientos de enfermedades como babesiosis, tripanosomiasis y leishmaniasis. Para esta última enfermedad es utilizado como tratamiento de segunda línea y administrada por vía intravenosa o intramuscular con una dosis de 2-4 mg/Kg al día de 4 a 7 dosis. Este fármaco

actúa inhibiendo la síntesis de ADN, ARN, fosfolípidos y proteínas. Su uso ha disminuido por la resistencia rápida que genera y por la causa de efectos secundarios como la inducción a diabetes, nefrotoxicidad, pancreatitis, hipotensión, entre otros (Nguewa *et al.*, 2005; Kuhlmann y Fleckenstein, 2017).

### **2.5.3. Tratamiento de leishmaniasis en el Perú**

En el Perú se utiliza como tratamiento de primera línea los antimonios pentavalentes como el antimoniato de N-metil-glucamina y estibogluconato de sodio con una dosis de 20 mg/Kg al día durante 10 días (vía endovenosa); solo en casos adversos en las que no se pueda aplicar por esta vía será por vía intramuscular, ya que la aplicación por esta última vía es muy dolorosa. En casos severos se utiliza los tratamientos de segunda línea como la anfotericina B para lesiones mucosas leves a moderadas por vía endovenosa con una dosis de 0,5 mg/Kg/día con un máximo de 50 mg al día (Instituto Nacional de Salud, 2000).

## **2.6. TERAPIA FOTODINÁMICA**

### **2.6.1. Historia**

El uso de la luz en terapias de la piel ha sido utilizado desde la antigüedad (3000 aC) por los egipcios, chinos, griegos e hindúes, donde exponían a la persona a la luz solar y pensaban que curaba ciertas enfermedades como el vitiligo, psoriasis, raquitismo, etc. (Daniell y Hill, 1991). A finales del siglo XIX, el médico Danés Niels Finsen ganó el premio Nobel de Medicina y Fisiología en 1893 demostrando el uso de luz filtrada por calor con una lámpara de arco de carbono llamada “lámpara de Finsen” para el tratamiento del lupus vulgar (lesiones cutáneas producido por *Mycobacterium tuberculosis*) (Sack, 2015). A inicios del siglo XX, Oscar Raab y su profesor Von Tappeiner en 1900 observaron por primera vez el efecto fotodinámico al ensayar con *Paramecium caudatum*, exponiéndolos a la luz con naranja de acridina como

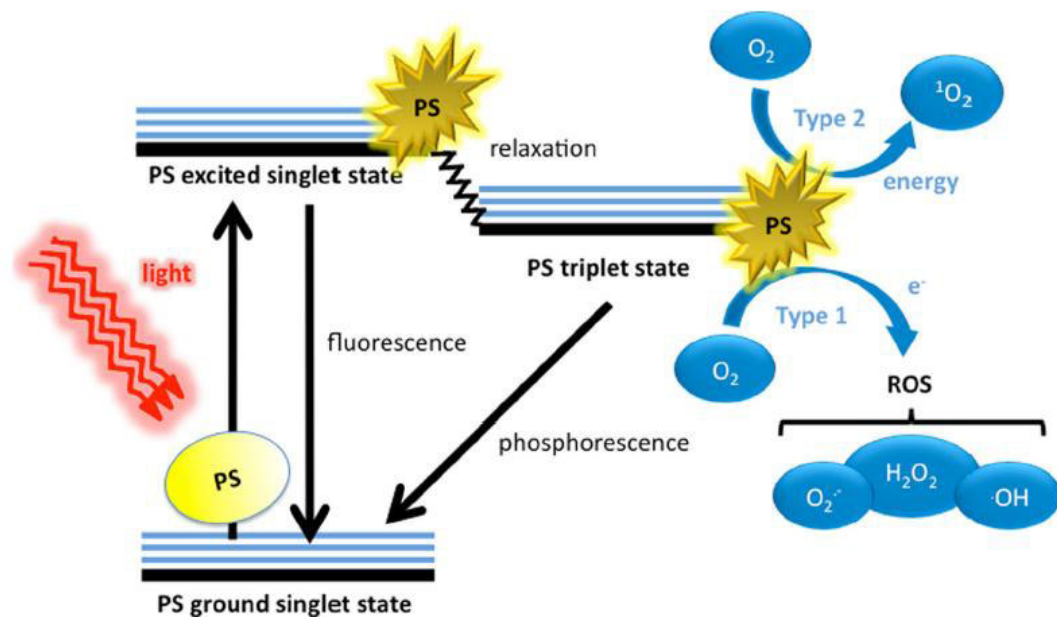
fotosensibilizador (Gold, 2011); posteriormente en 1904, Von Tappeiner y Jodblauer percibieron que la presencia de oxígeno era necesaria para que se produzca la “reacción fotodinámica” utilizando eosina al 5% como fotosensibilizador para el tratamiento de cáncer en la piel (Issa y Manela, 2010); así en 1907, difundieron este ensayo a través de su libro “Die sensibilisierende Wirkung fluoreszierender Substanzen; gesammelte Untersuchungen über die photodynamische Erscheinung” (Tappeiner y Jodlbauer, 1907). Posteriormente se fue utilizando la luz UV a través de lámparas artificiales con el uso del cuarzo; desde 1982 el uso de la fototerapia se fue utilizando a menudo en terapias contra el cáncer con luz visible y UV, desarrollándose así en los últimos años nuevas alternativas para enfermedades como vitiligo, psoriasis, herpes virus tipo I, verrugas, esclerodermia, leishmaniasis cutánea etc.(Roelandts, 2002; Mordon *et al.*, 2012)

### **2.6.2. Mecanismo de acción**

La TFD se caracteriza por ser un proceso selectivo basándose principalmente en la interacción de tres componentes no tóxicos fundamentales como el fotosensibilizador (FS), fuente de luz y oxígeno molecular ( $O_2$ ). Este tratamiento consiste inicialmente en la aplicación sistémica o tópica del FS en la zona afectada, este posteriormente es activado al ser irradiado con luz visible a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de entre 600-850 nm e intensidad de  $150 \text{ mW/cm}^2$ , favoreciendo la inserción en el tejido afectado. Simultáneamente el FS en estado basal al ser activado en presencia del  $O_2$  transfiere energía, donde una parte del FS produce fluorescencia, liberándolo como luz, y la otra parte es liberada en forma de calor, produciendo cambios a un estado de triplete excitado con la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y una especie citotóxica llamada oxígeno singlete ( $^1O_2$ ), (Moreno *et al.*, 2007; Taylor *et al.*, 2011).

El estado singlete se lleva a cabo por dos mecanismos de Tipo I o Tipo II (Figura 10), para ello se debe de tener en cuenta factores como: concentración del oxígeno,

constante dieléctrica del tejido, pH y estructura del fotosensibilizador. La reacción de Tipo I inicia al combinarse el FS con el tejido afectado, lo cual genera la transferencia de un electrón al interactuar con el  $O_2$  (estado básico), produciendo especies reactivas de oxígeno (ERO) como el anión superóxido ( $O_2^-$ ), radical hidroxilo ( $-OH$ ) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). La reacción de Tipo II se produce por la transformación del estado triplete al liberar energía directa del FS e interactuar con  $O_2$  (estado de triplete básico) con la finalidad de generar oxígeno singlete excitado ( $^1O_2$ ), esta forma es esencial para generar apoptosis y/o necrosis de celular (Dai *et al.*, 2012; Aureliano *et al.*, 2014; Kwiatkowski *et al.*, 2018). Estos dos tipos de reacciones pueden ocurrir al mismo tiempo provocando un daño oxidativo en el tejido afectado; sin embargo, en la reacción de tipo I se produce la degradación del PS a causa de la disminución del oxígeno, es así como la reacción de Tipo II es de mayor importancia por la extensión del oxígeno singlete con un radio de acción de hasta aproximadamente 300 nm causando daño a nivel de los lisosomas, retículo endoplasmático (autofagia), las mitocondria (apoptosis) y la membrana celular (necrosis) (Josefsen y Boyle, 2008; Kwiatkowski *et al.*, 2018).



**Figura 10.** Esquema de las reacciones de Tipo I y Tipo II.

(Fuente: Dai *et al.*, 2012).

### **Fotosensibilizadores (FS)**

Estos componentes son fundamentales debido a su capacidad de generar especies reactivas de oxígeno (ERO), que al estar en contacto con el oxígeno molecular produce muerte celular. Los FS deben cumplir ciertas características como: ser de naturaleza pura, composición conocida, tener toxicidad en presencia de luz, concentrarse en la célula blanco, eliminación pronta para garantizar un nivel bajo de toxicidad sistémico, generación de oxígeno singlete y absorción de luz en un rango de 600 a 850 nm (Detty *et al.*, 2004; Allison *et al.*, 2004; Durgut, 2014). Existen aproximadamente 400 compuesto, pero no todos son utilizados para pruebas en salud; los más importantes están organizados según su estructura química, naturaleza (catiónica, aniónica o neutra). Divididas también en tres familias como las porfirinas, las clorinas y las ftalocianinas; donde se clasifican según se distribución, selectividad y excreción como agentes de primera, segunda o tercera generación (Tabla 2) (Taylor *et al.*, 2011; Oniszczyk *et al.*, 2016).

Los agentes de primera generación como las porfirinas, derivado de hematoporfirina, se caracterizan por ser de baja pureza química, lo cual genera bajos niveles de excreción, liberación de energía y penetración en el tejido blanco, debido a que la absorción máxima de longitud de onda corta es de 630 nm y también por producir algunos efectos de hipersensibilidad en la piel irradiada debido a su larga vida media y alta acumulación en el tejido blanco. Debido a los efectos de los primeros agentes en la década de 1980 se comenzó el estudio con los agentes de segunda generación como benzoporfirinas, benzofenotiazinas, clorinas, porficene y ftalocianina, ya que

tienen alta pureza química, absorción de luz y selectividad por el tejido blanco con un rango de longitud de onda de 650 a 800 nm; estos agentes de segunda generación poseen menos efectos secundarios, pero son insolubles en agua y dificultan la administración por vía intravenosa (Taylor *et al.*, 2011; Salazar, 2015; Kwiatkowski *et al.*, 2018).

**Tabla 2.** Clasificación de los fotosensibilizadores por familias.

FAMILIA	NOMBRE	PRESENTACIÓN COMERCIAL	UTILIZACIÓN Y USO COMÚN	DOSIMETRÍA, PROPIEDADES FOTOQUÍMICAS Y FOTOFÍSICAS
<b>PORFIRINAS</b>	Hematoporfirinas y derivados	Fotofrin® Fotosan® Fotocan®	Diferentes tipos de tumores	2 mg/Kg a 150 J/cm <sup>2</sup>
	Prodroga ALA	Levulan®	Tumores y lesiones cutáneas <sup>¥</sup>	20% ALA a 150 J/cm <sup>2</sup>
	Benzoporfirinas	Visudine®	Transtornos neurovasculares, degeneración macular, coriorretinopatías y lesiones cutáneas <sup>¥</sup>	Aplicaciones sencillas de una inyección de 6 mg/Kg a 100 J/cm <sup>2</sup>
	Texafirinas	Antrin®, Lutex u Optrin™	Algunas formas de cáncer, enfermedades oculares, coronarias y placa ateromatosa	Soluble en agua, se activa aproximadamente a 730 nm
<b>CLORINAS</b>	Temoporfirinas	Foscan®	Diferentes tipos de tumores	0,15 mg/Kg a 660 nm
	Purpurinas	Purlitina®	Cáncer de células escamosas y sarcomas de Kaposi	Activa a 660 nm
	El mono-L-aspartil-clorina o NPe6	-----	Lesiones de tipo oftálmico	2,5 y 3,5 mg/Kg a 100 J/cm <sup>2</sup> o 664 nm
	Talaporfirina de sodio	LS11	Cáncer, lesiones cutáneas	Amplio espectro de absorción (400-664 nm)
	Fotoclorina	Fotoclo®	Tratamiento de tumores en perros y gatos y cáncer de	0,15 mg/Kg con dosis de luz de 48 horas a 150 J/cm <sup>2</sup>



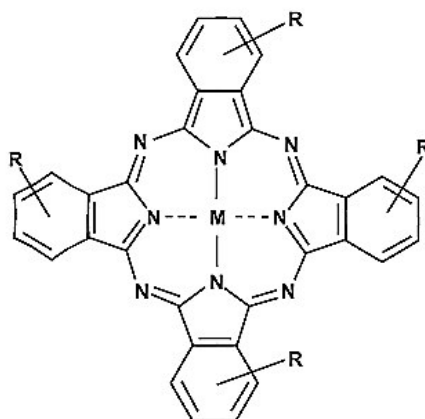
			esófago en humanos	
<b>FTALOCIANINAS</b>	Ftalocianinas de aluminio y zinc	Fotosens®	Lesiones cutáneas, tumores de cabeza y cuello	Activa entre 650 - 850 nm y a 100 J/cm <sup>2</sup>

¥ AF utilizados en estudios *in vitro* e *in vivo* para fototerapia en leishmaniasis cutánea.

(Fuente: Taylor *et al.*, 2011).

## FAMILIA DE LAS FTALOCIANINAS

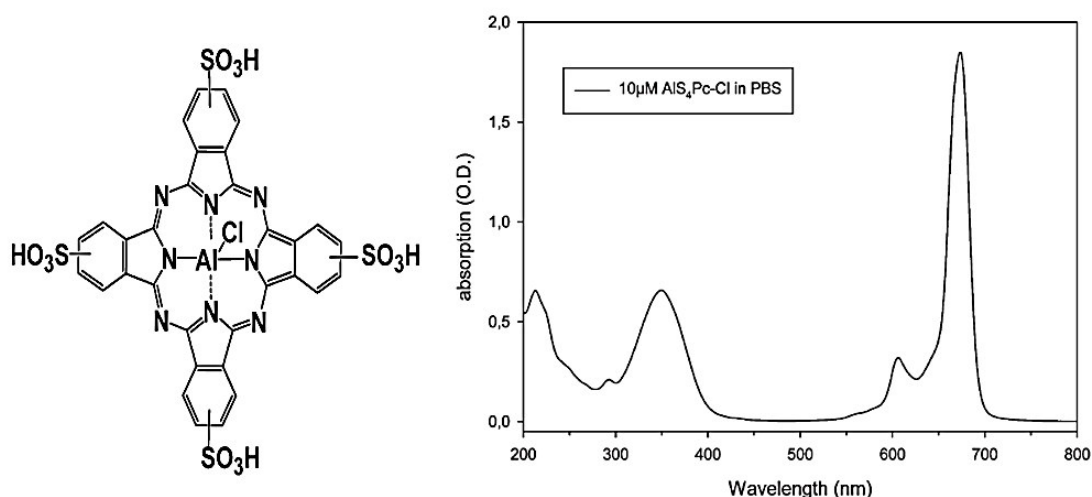
La familia de las ftalocianinas (Pcs), pertenecen a los fotosensibilizadores de segunda generación. En general, son empleados como pigmentos, tintes (verde y azul) y como FS por la producción de efectos catalíticos; esta última aplicación es aprovechada gracias a que la estructura al ser irradiada no sufre modificación durante una reacción química (Ben-Hur y Rosenthal, 1985). Esta familia, es análoga sintética a la familia de las porfirinas, tiene compuestos macrocíclicos planos aromáticos conformados por cuatro grupos isoindol y unidos a través de 4 átomos de nitrógeno. Poseen una estructura simétrica, en el cual posee anillos de benceno en el borde, que beneficia el tiempo de absorción y posee una cavidad central muy pequeña de 0,2 Å, donde se acomoda el ion (Al, Si, etc.) sin perder su planaridad (Figura 11) (Sharman *et al.*, 1999; Torre *et al.*, 2003; Manjón, 2016).



**Figura 11.** Estructura general de ftalocianina (Pc). M: ion metálico central (Al, Zn, Co, etc.) y R: posibles sustituyentes del anillo de benceno.

**(Fuente:** Escobar *et al.*, 2006).

La  $\text{PcAlClS}_4$  es una métalo-ftalocianina (ion metálico de transición), tiene propiedades favorable para la TFD, en la cual la sulfonación actúa favoreciendo el aumento de la solubilidad en solventes polares y tiene propiedades fotofísicas, lo cual favorece el rango de absorción de 640 - 710 nm en luz visible cercano al rojo (Figura 12), aumentando así la penetración de luz en el tejido, también son buenos productores de oxígeno singlete y de baja toxicidad (Detty *et al.*, 2004; Gmurek *et al.*, 2011; Amin *et al.*, 2012).

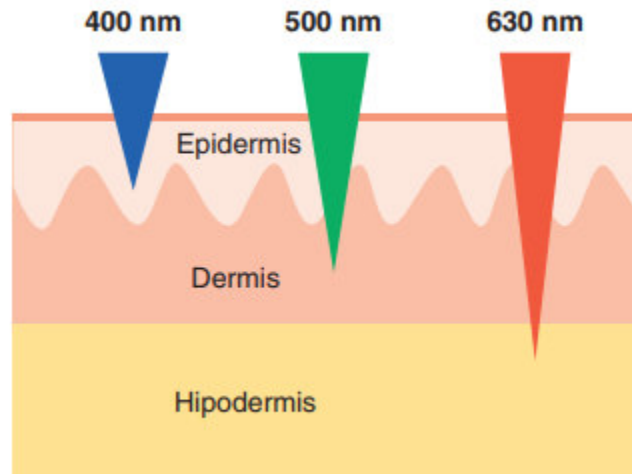


**Figura 12.** Estructura química y espectro de absorción en la región UV/Vis de ftalocianina de aluminio tetrasulfonada clorada (PcAlClS<sub>4</sub>).

(Fuente: Gmurek *et al.*, 2011; Amin *et al.*, 2012).

## FUENTE DE LUZ

Existen tres tipos de fuentes de luz de amplio espectro que son utilizados en la TFD como las lámparas de amplio espectro, lámparas de diodo (LED, Light-emitting diode) y los láseres. La elección adecuada de una de estas lámparas va a depender de la longitud de onda con que penetre luz en el tejido blanco. Generalmente, los picos de la banda Q adecuados están en el rango de 625-633 nm son los elegidos, ya que en este rango es capaz de penetrar hasta la hipodermis (Figura 13) (Issa y Manela, 2010; Vicentini *et al.*, 2017).

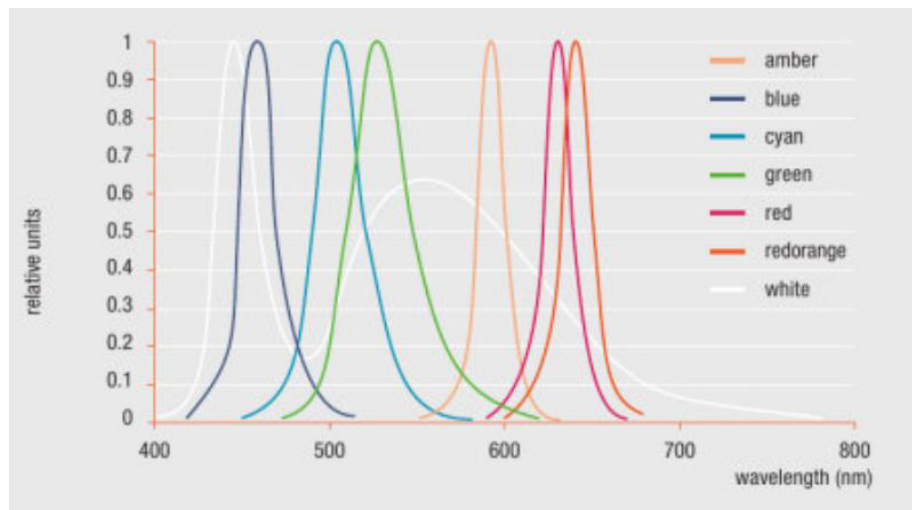


**Figura 13.** Profundidad de penetración de la longitud de onda en los estratos de la piel.

(Fuente: Vicentini *et al.*, 2017).

La fuente de luz ideal debe de cumplir ciertas características como: tener una buena absorción por el FS, buena penetración en el tejido, emitir una  $\lambda$  adecuada, mínimo tiempo de administración, generar pocos efectos secundarios (dolor, ampollas, etc.) y producir una alta tasa de recuperación del área irradiada (Mordon *et al.*, 2012). Actualmente, el uso de las lámparas LED cumple con las características ya mencionadas y emite un rango estrecho de longitud de onda, determinados por la cantidad de energía del semiconductor de LED (fosfuros o arsenios), que va desde el UV/visible hasta el infrarrojo cercano, es así como se refleja en un cambio de color según la energía emitida: rojo (630-890 nm), verde (525-555 nm), azul (450- 480nm), etc. (Figura 14) (LEDVANCE, 2019).

Las ftalocianinas pueden ser excitadas por la región de color roja (630-890 nm), lo cual permite un mejor rendimiento, distribución y penetración en el tejido blanco. También favorece a la reducción de consumo de energía, tamaño de lámparas, lo cual hace que su producción sea menos costosa (Taylor *et al.*, 2011; Kuonen y Gaide, 2014).



**Figura 14.** Distribución de las diferentes longitudes de onda de una emisión de lámparas LEDs determinadas por distintos tonos de colores.

(Fuente: LEDVANCE, 2019).

### III. HIPÓTESIS

El uso de la ftalocianina de aluminio clorada tetrasulfonada (PcAlClS<sub>4</sub>) en la terapia fotodinámica tiene actividad fototóxica frente a amastigotes de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* experimentalmente infectados en *Mesocricetus auratus* (hámster dorado).

### IV. OBJETIVOS

#### 4.1. OBJETIVO GENERAL

- Determinar el efecto fototóxico de la ftalocianina de aluminio clorada tetrasulfonada (PcAlClS<sub>4</sub>) en el tratamiento de un cuadro de leishmaniasis cutánea por *Leishmania (L.) amazonensis* inducida en *Mesocricetus auratus* (hámster dorado).

#### 4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar el efecto fototóxico *in vivo* de la ftalocianina de aluminio clorada tetrasulfonada (PcAlClS<sub>4</sub>) aplicadas en solución y crema para determinar su actividad frente a amastigotes de *Leishmania (L.) amazonensis*.
- Evaluar el cuadro evolutivo de las lesiones ulcerosas de la leishmaniasis en *Mesocricetus auratus* post tratamiento de la TFD.
- Evaluar la eficacia de la TFD mediante observaciones microscópicas de cortes histológicos de tejidos afectados por la presencia/ausencia de amastigotes a nivel tisular mediante la coloración hematoxilina-eosina.

## **V. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **5.1. MATERIAL BIOLÓGICO**

- Cepa de *Leishmania (L.) amazonensis* proporcionada por el Laboratorio de Referencia Nacional de Leishmaniosis (LRNL) del Instituto Nacional de Salud (INS).
- Hámster dorado (*Mesocricetus auratus*), obtenidos del bioterio de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

### **5.2. MATERIAL QUÍMICO**

- Ftalocianina de aluminio tetrasulfonada clorada ( $\text{PcAlS}_4\text{Cl}$ ) en crema y en solución, proporcionados por el Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Química Orgánica - Facultad de Química e Ingeniería Química de la Universidad Nacional Mayor San Marcos (UNMSM), Lima, Perú.

### **5.3. MÉTODOS**

#### **5.3.1. Cultivo de promastigotes**

La cepa de *Leishmania (L.) amazonensis* fue cultivada en el medio Schneider's Drosophila (Gibco®) suplementado con 10% de suero bovino fetal inactivado (SBFi), pH 7,2 a 28°C.

#### **5.3.2. Obtención de promastigotes metacíclicos**

Los promastigotes fueron cultivados en 5 ml de medio Schneider's Drosophila (Gibco®) suplementado con 10 % de SBF inactivado, pH 5 a 28°C (Izarra, 2018). Después de cinco días (fase estacionaria) se vertió a un tubo Eppendorf y se centrifugó a 6000 rpm por 15 minutos (se decantó el sobrenadante) y se realizó dos lavados sucesivos agregando 2ml de solución salina fisiológica (SSF) al 0,89% con una concentración final de  $1 \times 10^8$  parásitos/mL.

Por último, se incorporó lectina de maní (50 µg/ml) a un volumen de 1:1 con la suspensión de parásitos preparado anteriormente y se incubó por 45

minutos a temperatura ambiente (28°C). Posteriormente se centrifugó a 1100 rpm por 5 minutos, recolectando al final el sobrenadante con una concentración de parásitos de  $1 \times 10^6$  /100  $\mu$ L de SSF (Gamboa *et al.*, 2008) (Anexo 1).

### 5.3.3. Infección experimental

Se emplearon un total de 15 hámsteres hembras de 6 semanas mantenidos en el bioterio de la Facultad de Ciencias Biológicas (UNMSM) y se les inoculó promastigotes metacíclicos de *Leishmania (L.) amazonensis* intradérmicamente en la zona sacro lumbar (base de la cola) a una concentración de  $1 \times 10^6$  parásitos/mL en 100 $\mu$ L de SSF (Figura 15).

Los hámsteres fueron clasificados en 2 grupos (Tabla 3). El grupo 1, conformado por 6 hámsteres, los cuales luego de su inoculación con promastigotes metacíclicos y posterior aparición de úlceras fueron expuestos al efecto del FS (en crema y en solución), más la irradiación a 675.5 nm, 50 J/cm<sup>2</sup>. Los otros 6 hámsteres (grupo 2) se subdividió en dos grupos, donde el subgrupo C1 sólo se les aplicaría el FS (en crema y en solución) pero sin irradiarlos y mantenidos en oscuridad. Los hámsteres del subgrupo C2, solo fueron inoculados y no se les aplicó tratamiento hasta culminar los experimentos.

**Tabla 3.** Esquema general de grupos experimentales.

Presentación del fotosensibilizador (PcAlS <sub>4</sub> Cl)	Grupo 1	Grupo 2	
	Inoculados e irradiados	Inoculados no irradiados (C1)	Solo inoculados (C2)
En crema	3	3	3
En solución	3	3	

Dónde:

**C1:** Solo se le aplicó el FS en oscuridad.



**C2:** Sin tratamiento (control).



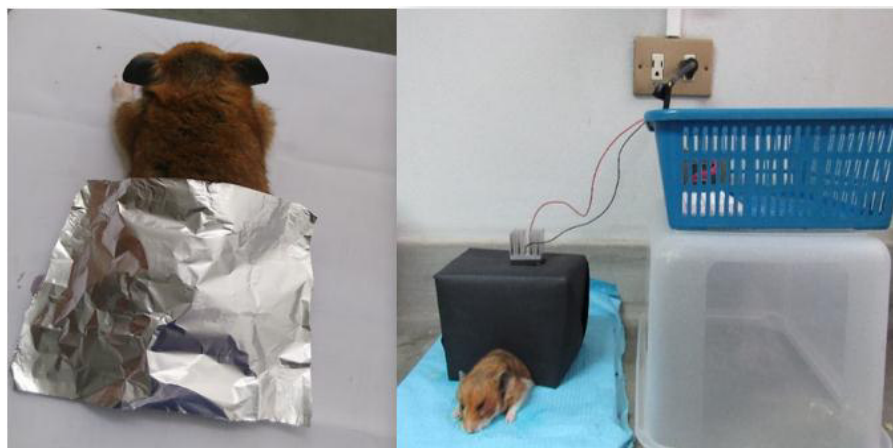
**Figura 15.** Inoculación de promastigotes metacíclicos de *L.(L.) amazonensis* en la zona sacro lumbar.

#### **5.3.4. Terapia fotodinámica con ftalocianina de aluminio clorada tetrasulfonada (PcAICIS<sub>4</sub>)**

El tratamiento se inició al observarse la formación de las induraciones y úlceras características de la leishmaniasis cutánea (60 días después de la infección).

Los hámsteres fueron anestesiados con 0,5 ml de Ket-A-Xil® (por vía intramuscular) antes de iniciar cada tratamiento.

Luego de 5 minutos se aplicó 100µL de la solución de PcAIS<sub>4</sub>Cl (100µg/40µL) por vía intradérmica de la zona afectada y se dejó reposando por 15 minutos cubierto con papel aluminio (Figura 18). Posteriormente el grupo 1 fue irradiado en una cámara oscura con una lámpara LED de luz visible a 675.5 nm, 50 J/cm<sup>2</sup>, por 30 minutos (Figura 16). Esta sesión se repitió cada cinco días. Al grupo 2 no se le aplicó el tratamiento fotodinámico.



**Figura 16.** Reposo después de haber sido aplicada la PcAIS4Cl en la base de la cola (derecha) y la aplicación de la TFD.

Antes de cada tratamiento se realizaron mediciones del ancho y largo de cada induración y úlcera con un calibrador vernier, con la finalidad de evaluar el curso de la evolución clínica mediante el área de cada lesión en  $\text{cm}^2$ , según Hernández (2010).

### **5.3.5. Eficacia de la TFD mediante técnicas histológicas**

Al concluir el tratamiento se esperó 12 semanas (post tratamiento) se sacrificaron los hámsteres con vapores de cloroformo en un ambiente cerrado y previamente anestesiados con Ket-A-Xil®.

Los tejidos que fueron sometidos al tratamiento fueron seccionados con la ayuda de un bisturí e inmediatamente puestos en formol al 10% por 24 horas, para luego ser trasladados a alcohol de 70°, previamente lavados con agua destilada.

Posteriormente, muestras de estos tejidos fueron cortados en pequeños segmentos de 5x5 cm, y rotulados debidamente según su procedencia. Para su procesamiento se siguió la siguiente serie de pasos: deshidratación, aclaramiento, inclusión, coloración y montaje en lámina (Anexo 2).

- A.** La deshidratación se realizó mediante una gradiente de alcoholes. Iniciando desde 70°, 90°, 96° y alcohol absoluto.
- B.** La aclaración se realizó mediante una serie de pasajes de Xilol.
- C.** La pre-inclusión se realizó también mediante tres pasajes de parafina líquida a una temperatura de 56 °C.
- D.** La inclusión consistió en atrapar los tejidos, donde se utilizaron unas celdas metálicas, dentro de estas celdas se encerraron los tejidos en un bloque de parafina sólida debidamente etiquetados. Por último, se dejó solidificar a temperatura ambiente y con la ayuda de un micrótopo rotativo (Laboratorio de Parasitología de Fauna Silvestre y Zoonosis - UNMSM), se realizaron los cortes histológicos de un grosor de 6 µm.
- E.** La coloración fue mediante la tinción hematoxilina-eosina (H-E), según la técnica de Harris modificada.
- F.** Por último, se procedió al montaje con Entellan y se etiquetaron debidamente según la zona de procedencia, para luego dejar secar a temperatura ambiente y observar en el microscopio a un aumento de 100X, 400X y 1000X.

#### **5.3.6. Registro fotográfico**

Todas las fotos del trabajo fueron tomadas con la cámara digital Canon Power Shot SX530HS y las imágenes de las observaciones microscópicas de los cortes histológicos fueron visualizadas con el microscopio BioBlue.Lab y tomadas con la cámara ImageFocus v4.

#### **5.2.7. Consideraciones éticas**

Para el uso de animales de experimentación, se contó con la aprobación del Comité de Ética de la Facultad de Medicina Humana - Universidad Nacional Mayor de San Marcos, emitido mediante el Acta N° 19-0038 (Anexo 2).

## VI. RESULTADOS

### 6.1. Evaluación del efecto fototóxico *in vivo* de la ftalocianina de aluminio tetrasulfonada clorada (PcAlClS<sub>4</sub>) en solución y crema para determinar su actividad frente a amastigotes de *L. (L.) amazonensis*.

La infección con promastigotes metacíclicos de *L. (L.) amazonensis* a  $1 \times 10^6$  parásitos/100μL de SSF produjo inicialmente lesiones características de la leishmaniasis cutánea, tales como: elevaciones de la piel (induraciones) y úlceras. Estos signos se evidenciaron aproximadamente a partir de ocho semanas después de ser inoculados en la zona sacro lumbar (base de la cola).

Sin embargo, las lesiones no se manifestaron en todos los ejemplares de los hámsteres inoculados. Del total de hámsteres (15), solo resultaron con ulceración típica de leishmaniasis cutánea 7 ejemplares, motivando de esta manera una redistribución para continuar con la parte experimental tal como se muestra en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Número de ejemplares de hámsteres que presentaron ulceración positiva a la inoculación de *L. (L.) amazonensis* para su tratamiento posterior con PcAlS<sub>4</sub>Cl.

PcAlS <sub>4</sub> Cl	Grupo 1	Grupo 2	
	Inoculados e irradiados	Inoculados no irradiados (C1)	Solo inoculados (C2)
En crema	1	1	1
En solución	3	1	

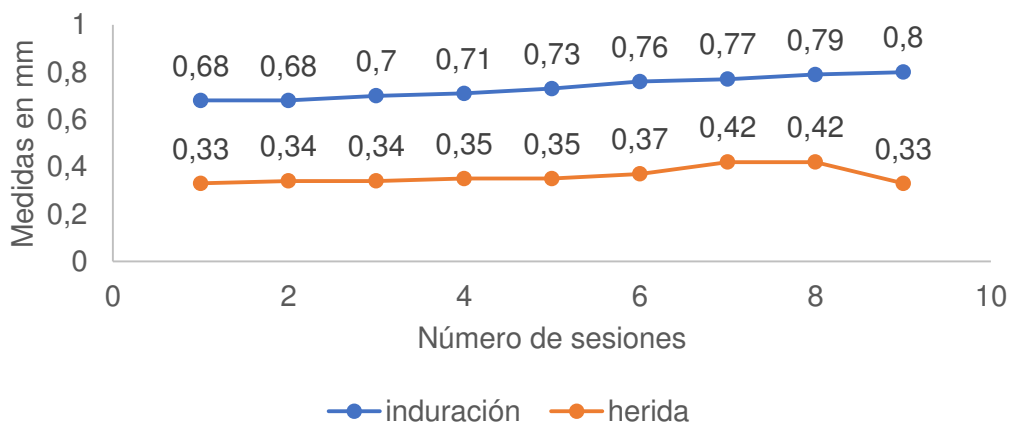
Dónde:

**C1:** solo se le aplicó el FS y mantenido en oscuridad.

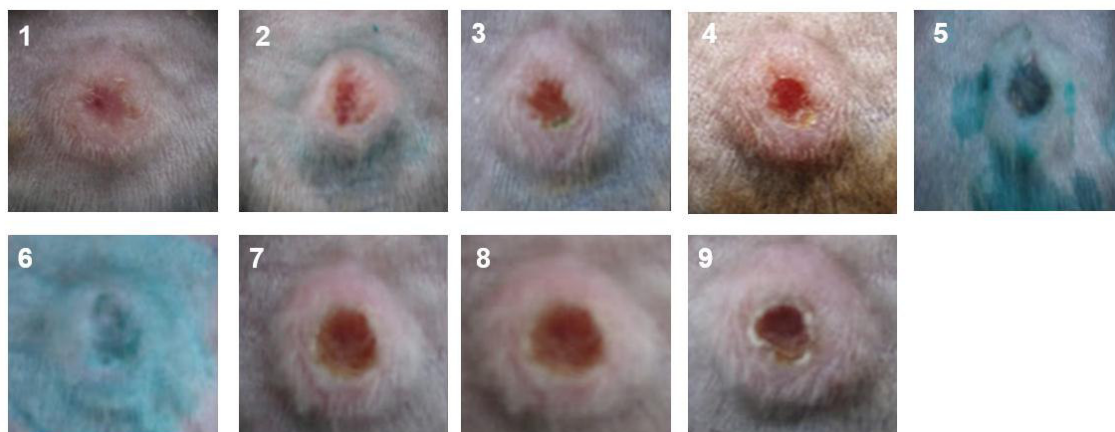
**C2:** solo inoculado, sin ningún tratamiento (control).

Los resultados luego del tratamiento fotodinámico con PcAlClS<sub>4</sub> en crema solo manifestaron la persistencia de la ulceración hasta por 9 semanas, sin evidencias de

cicatrización; muy por el contrario, persistió una ulceración aún más profunda (Figura 17 y 18) (Tabla 5) (Anexo 3). Adicionalmente, el tratamiento del único ejemplar sólo con crema sin irradiación no tuvo ninguna mejora al transcurrir el tiempo, ya que el tamaño de la induración y de las úlceras no variaron sustancialmente.



**Figura 17.** Gráfica de las medidas en mm del ejemplar tratado con PcAlClS<sub>4</sub> crema durante 9 sesiones, sin cambios favorables.

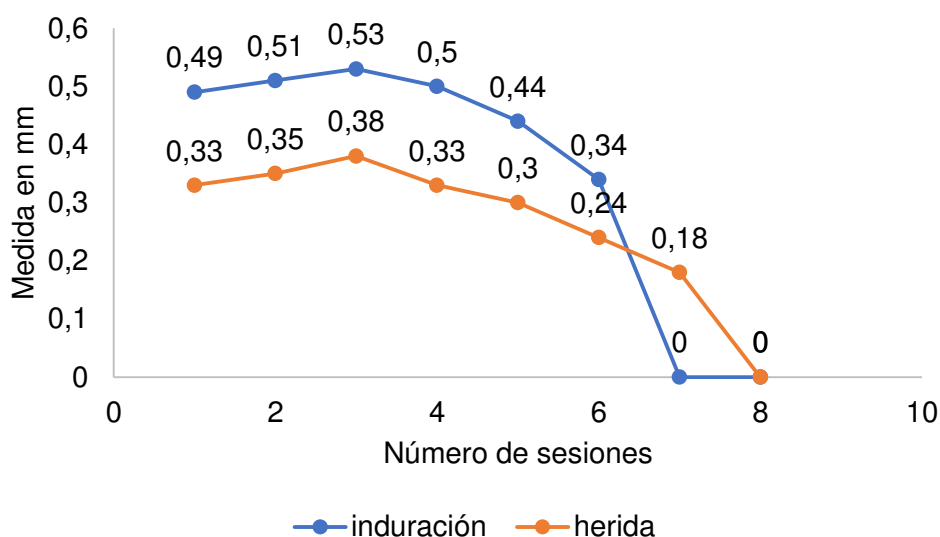


**Figura 18.** Evolución de las úlceras luego del tratamiento con PcAlClS<sub>4</sub> en crema e irradiado a 675.5 nm por 9 sesiones, con resultados desfavorables.

En el grupo destinado al tratamiento con PcAlClS<sub>4</sub> en solución los resultados fueron diferentes en relación con el caso anterior. Los tres ejemplares infectados (A, B y C) luego del tratamiento completo y prolongado mostraron finalmente una cicatrización

total; sin embargo, esta aparente eficacia fue dispareja, ya que uno de los ejemplares necesitó hasta 9 sesiones adicionales (6 semanas) para alcanzar su cicatrización completa.

En el caso del primer ejemplar (A) del hámster tratado con  $\text{PcAlS}_4\text{Cl}$  en solución, con el transcurso de las sesiones se pudo observar cambios en la zona ulcerada. Luego de las primeras irradiaciones se mostró inicialmente como una lesión de leve enrojecimiento y aparente agrandamiento de la úlcera, pero a partir de la cuarta sesión se fue notando una cicatrización gradual y favorable hasta su desaparición total a la octava sesión (Figura 19 y 20) (ANEXO 3).

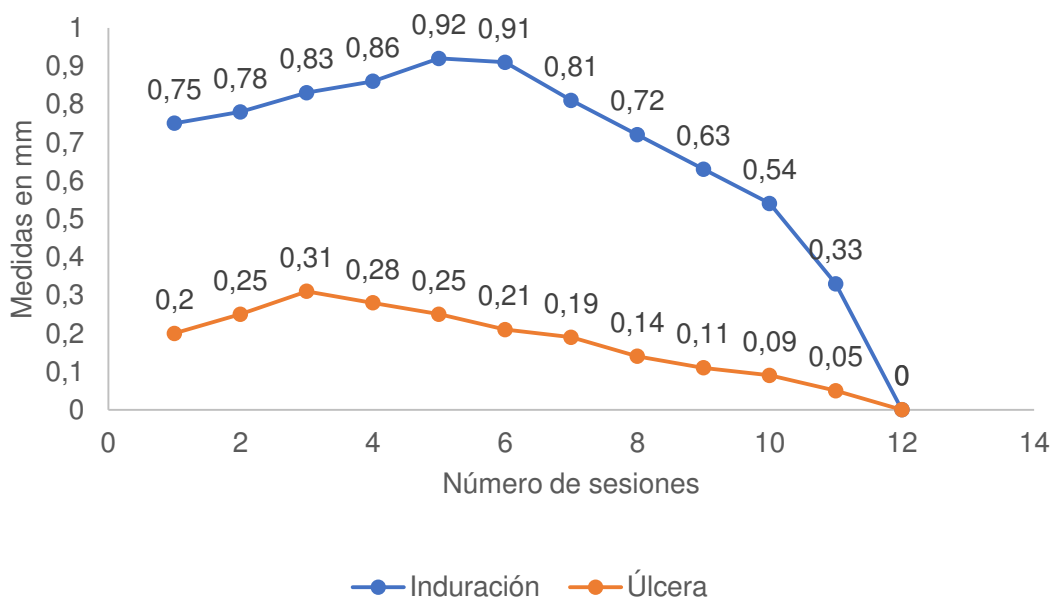


**Figura 19.** Gráfica de las medidas en mm del primer ejemplar (A) durante 8 sesiones tratado con  $\text{PcAlS}_4\text{Cl}$  en solución.

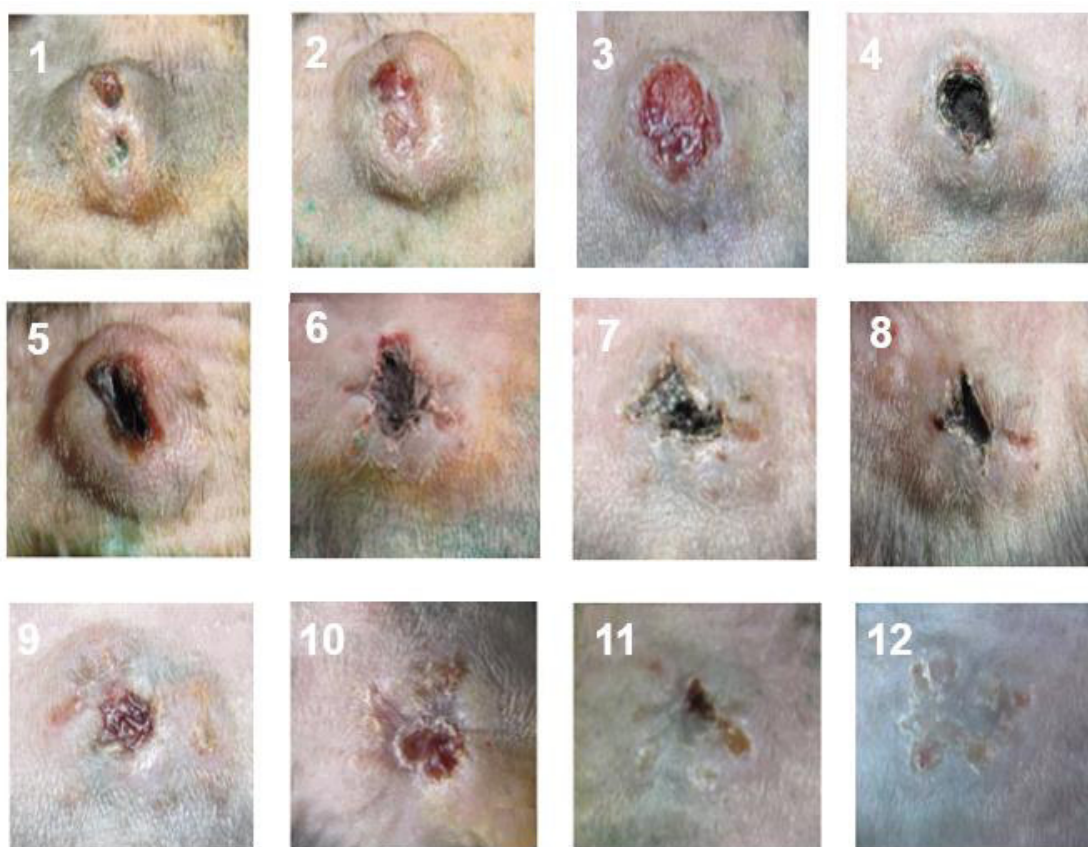


**Figura 20.** Evolución favorable del primer ejemplar (A) de las zonas ulceradas por *L. amazonensis*, luego de la TFD por 8 sesiones.

El segundo ejemplar (B), tuvo un efecto similar al primer ejemplar (A) en el transcurso de las sesiones. Se observó que luego de la quinta sesión hubo una cicatrización gradual y favorable hasta su desaparición total en la doceava sesión (Figura 21 y 22) (ANEXO 3).



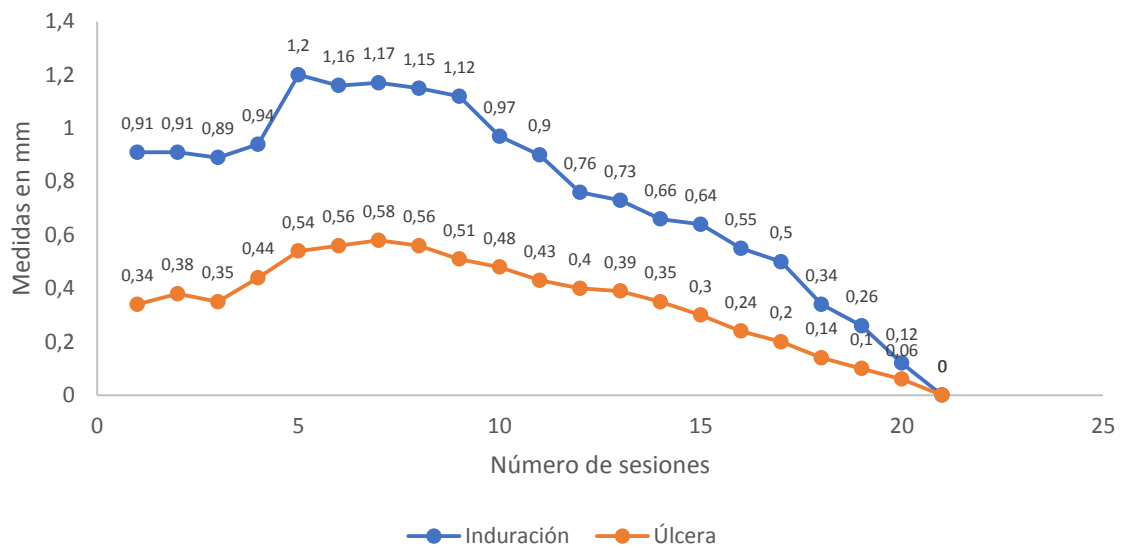
**Figura 21.** Gráfica de las medidas en mm del segundo ejemplar (B) durante 12 sesiones tratado con PcAICIS<sub>4</sub> en solución.



**Figura 22.** Evolución favorable del segundo ejemplar de hámster, las zonas ulceradas por *L. amazonensis*, luego de la TFD utilizando el fotosensibilizador PcAICIS<sub>4</sub> e irradiados a 675.5 nm por 12 sesiones.

El resultado del tratamiento del tercer ejemplar (C) del hámster con PcAICIS<sub>4</sub> fue diferente en relación con los otros dos ejemplares. La evolución de cicatrización fue más lenta, abarcando hasta veintiuna sesiones (15 semanas). Al finalizar, también se pudo evidenciar la desaparición de la induración y la úlcera. En el transcurso de las sesiones se pudo observar al inicio una úlcera de un color rojizo con una induración más elevada, lo cual conllevó a que el TFD se prolongara por más tiempo. A partir de la sesión doce se logró evidenciar la formación de costra y a partir de la sesión dieciocho, una disminución considerable de la induración hasta su desaparición (Figura 23 y 24) (ANEXO 3).



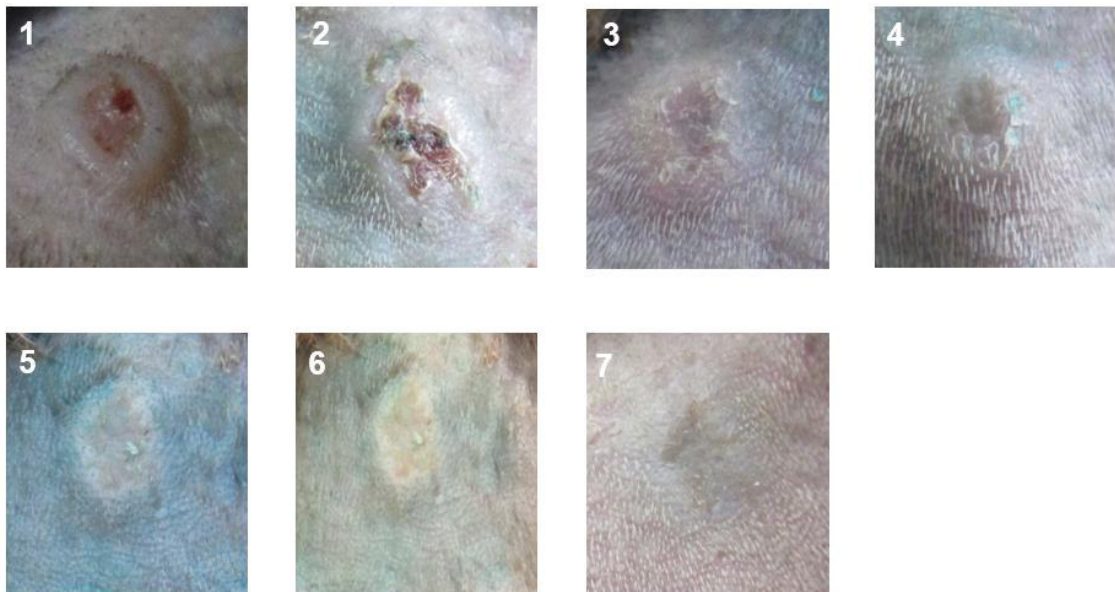


**Figura 23.** Gráfica de las medidas en mm del tercer ejemplar durante las 21 sesiones.



**Figura 24.** Evolución favorable de las zonas ulceradas por *L. amazonensis* inducidas en el tercer ejemplar (C) luego de la TFD utilizando el fotosensibilizador PcAlClS<sub>4</sub> e irradiados a 675.5 nm durante 21 sesiones.

En el caso del ejemplar del grupo 2 (C1) al cual solo se le aplicó PcAICIS<sub>4</sub> en solución, sin irradiación y mantenido en un ambiente oscuro; el proceso de aparente cicatrización fue más rápido en comparación de los que fueron irradiados, llevándose a cabo en solo 7 sesiones (5 semanas). La apariencia de estos síntomas (induración y úlcera) fueron menos grotescas a comparación de los otros ejemplares (Figura 25), lo cual permitió una recuperación pronta, ya que para la tercera sesión se observó la cicatrización de la úlcera.



**Figura 25.** Aspecto de lesiones del ejemplar del grupo 2 (C1) tratado solo con PcAICIS<sub>4</sub> en solución sin irradiación.

El otro hámster del grupo 2 (C2) infectado con *L. (L.) amazonensis*, no recibió tratamiento alguno en todo el proceso. Este ejemplar mostró un aumento continuo de la induración y la úlcera formada a los tres meses de inoculación (Figura 26) y mantuvo la característica típica la de leishmaniasis cutánea hasta el final del experimento.



**Figura 26.** Visualización de la induración y úlcera típica de leishmaniasis en el hámster dorado sin TFD luego de tres meses de inoculación.

## **6.2. Evaluación del cuadro evolutivo de las lesiones ulcerosas de la leishmaniasis en *Mesocricetus auratus* Pos-tratamiento de la TFD.**

Al recibir el último tratamiento, los tres ejemplares (A, B y C) fueron evaluados 12 semanas más luego de su última sesión para evidenciar la aparición de futuras lesiones en la zona. Al concluir este tiempo no se observaron lesiones o inflamaciones en la zona donde se produjo la infección (zona sacro lumbar) (Figura 27).

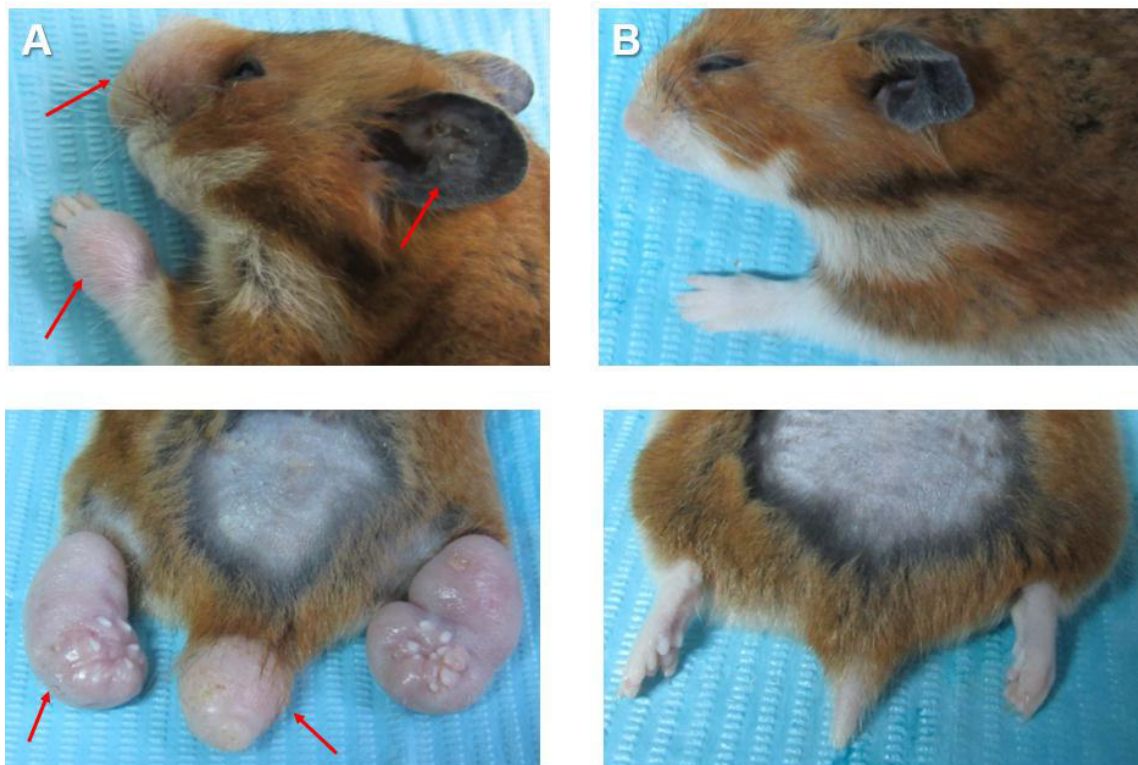


**Figura 27.** Aspecto (apariciencia) de las zonas evaluadas (sacro lumbar) del primer ejemplar (A), segundo ejemplar (B) y tercer ejemplar (C).

Al mismo tiempo (12 semanas, pos-tratamiento), se observó el aumento de tamaño de las orejas, la nariz, las patas (anteriores y posteriores) y la cola, como se evidencia en la figura 28, a comparación de un hámster tratado (sano) donde se observa las



mismas zonas ya mencionadas sin ninguna inflamación. Esta manifestación clínica es propia de la leishmaniasis mucocutánea, originado por la metástasis de la cepa de *L. (L.) amazonensis*.

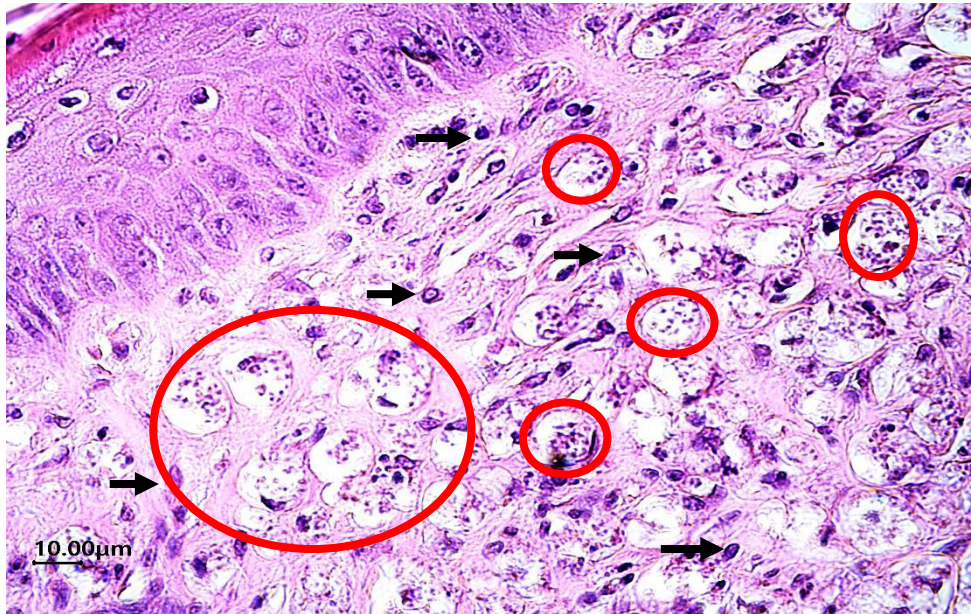


**Figura 28.** Observación de zonas no infectadas de un hámster dorado que se le aplicó la terapia fotodinámica (A) señalada con flechas rojas y de un hámster sano control (B).

### **6.3. Evaluación de la eficacia de la TFD mediante observaciones microscópicas de cortes histológicos de tejidos afectados por la presencia o ausencia de amastigote a nivel tisular mediante la coloración H-E.**

Luego de realizados los cortes histológicos de los tejidos tratados con  $\text{PcAIS}_4\text{Cl}$  en solución, coloreados mediante la técnica de H-E, se logró observar al microscopio abundantes infiltrados de macrófagos y en su interior abundantes amastigotes

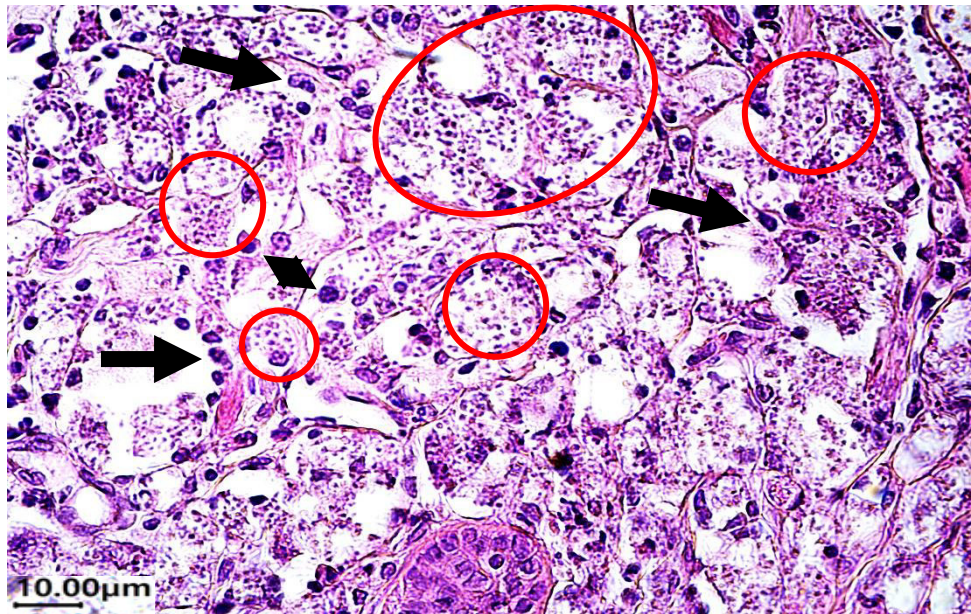
englobados en las fagolisosomas; también se evidenció la presencia de varios focos de células plasmáticas alrededor de los infiltrados (Figura 29).



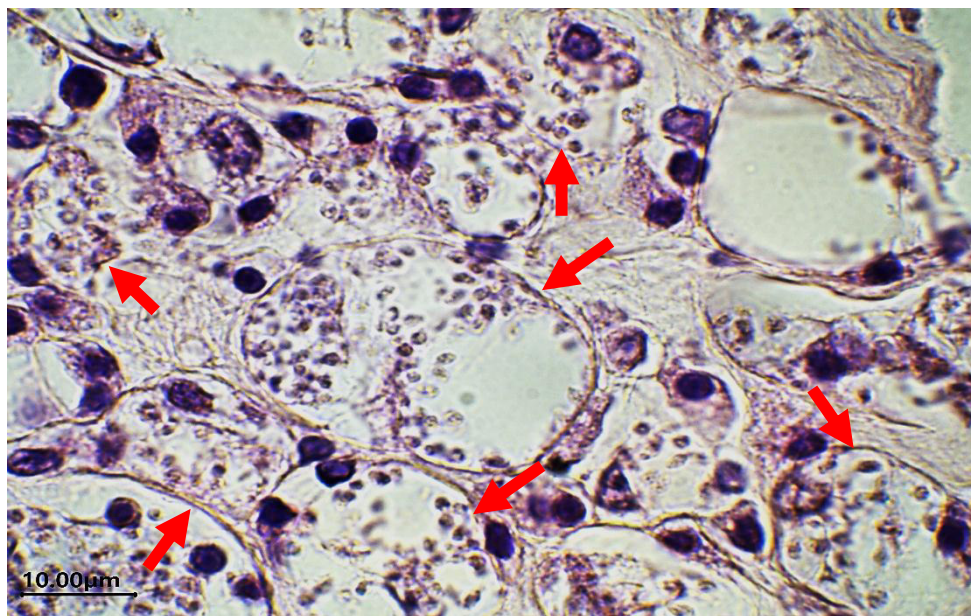
**Figura 29.** Corte histológico de piel tratada, coloreado con H-E. Se observa en los círculos de color rojo amastigotes englobados en fagolisosomas y las flechas negras señalan las células plasmáticas. Aumento de 400X.

La observación microscópica de todas las zonas inflamadas producto de la metástasis determinó una gran cantidad de infiltración de macrófagos vacuolados con abundantes amastigotes, ya sea adheridos internamente o agrupados, al ser tantos deformando la membrana del macrófago. También se logró observar abundantes células plasmáticas producto de la reacción inflamatoria producida en el tejido conjuntivo (Figura 30 y 31).





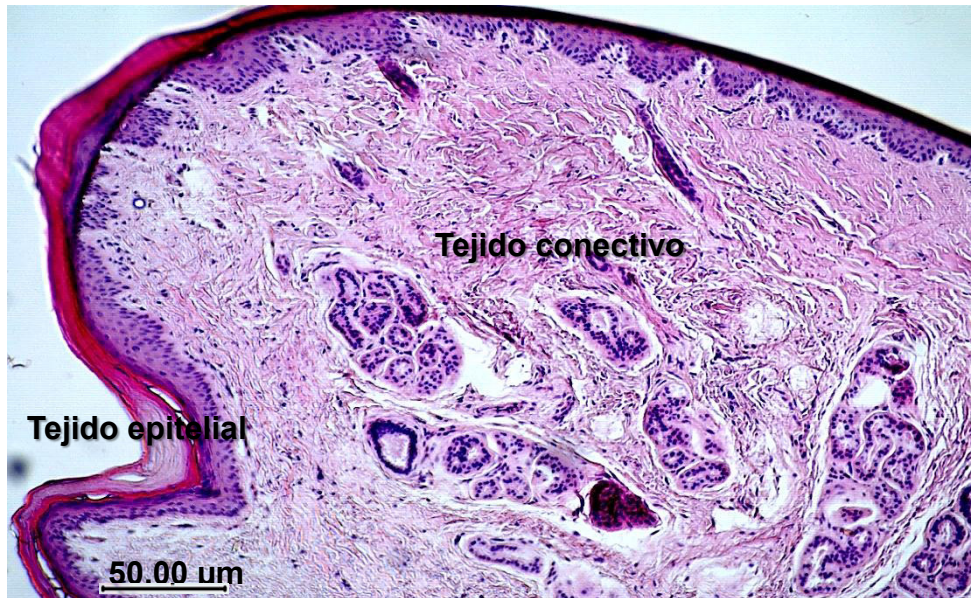
**Figura 30.** Corte histológico de la zona inflamada y coloreada con H-E. Se observa dentro de los círculos abundantes amastigotes y células plasmáticas señaladas por las flechas negras. Aumento de 400X.



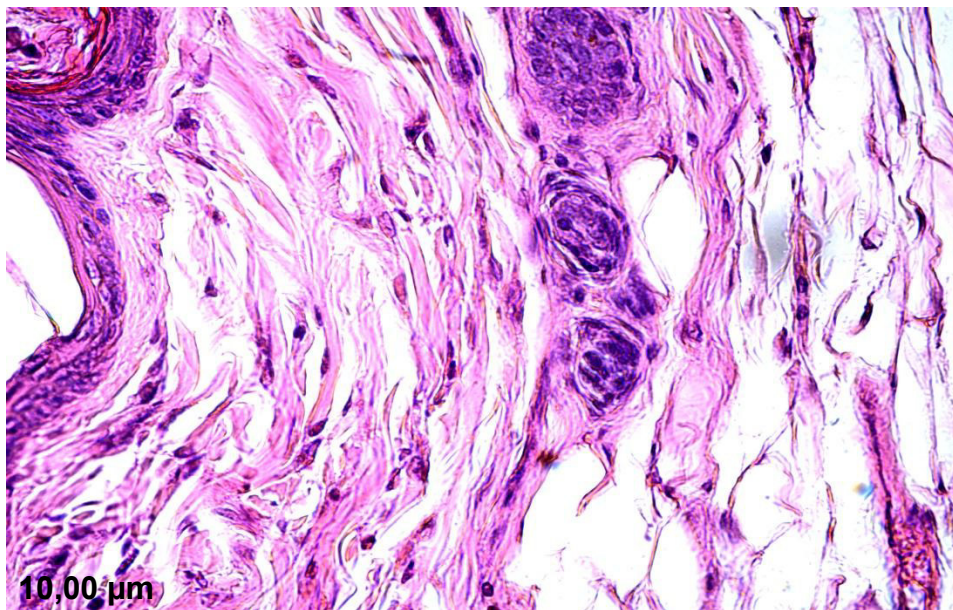
**Figura 31.** Corte histológico de piel (zona inflamada) y coloreada con H-E. Se observa macrófagos vacuolados con abundantes amastigotes de *L. (L.) amazonensis* en su interior. Aumento de 1000X.



En la figura 32 y 33 se observa el corte histológico de la piel de un hámster sano, donde se aprecia el tejido con ausencia de amastigotes y células plasmáticas. Se observa el tejido conectivo intacto, sin alteración y con presencia de fibroblastos, folículos, nervios, etc.



**Figura 32.** Corte histológico de piel sana, coloreado con H-E. Se observa el tejido epitelial y el tejido conectivo sin cambios morfológicos. Aumento de 100X.



**Figura 33.** Corte histológico de piel sana, coloreado con H-E. se observa el tejido conectivo sin alteraciones. Aumento a 400 X.



## VII. DISCUSIÓN

El tratamiento para la leishmaniasis cutánea y mucocutánea es de suma importancia a nivel nacional en los diversos departamentos endémicos del Perú, ya que afecta principalmente a personas de bajos recursos, de las cuales solo un 23.6% reciben tratamientos en un centro de salud, pero estos a su vez suelen dejarlos por los efectos adversos producidos por los antimonios pentavalentes y la gran mayoría (71.7%) tratan sus lesiones de forma tradicional, sin recibir tratamiento alguno. Generando así un estado drástico de evolución de las lesiones y la resistencia de los parásitos a estos tratamientos (Pineda-Reyes *et al.*, 2015). Debido a esos efectos causados, es que se busca una alternativa en la TFD. Actualmente esta terapia se aplica frente a diversas enfermedades dérmicas (vitiligo, psoriasis, etc.), oncológicas e infecciones cutáneas localizadas causadas por bacterias Gram positivas y Gram negativas (O’Riordan *et al.*, 2005; Salazar, 2015). La aplicación de este tratamiento frente a LC se viene probando desde el 2003 con diferentes familias de FS como porfirinas hasta el uso de las ftalocianinas, con la diferencia de que estas últimas tienen una mejor absorción en la región cercana al infrarrojo de 650-800 nm, estabilidad y selectividad mostrándose así como un tratamiento alternativo (Ben-Hur y Rosenthal, 1985; Taylor *et al.*, 2011; Salazar, 2015).

Las especies del género *Leishmania* representativas en el Perú con más casos reportados de la forma cutánea son *L. (Viannia) peruviana* y *L. (V.) braziliensis* y en última instancia es de la forma mucocutánea es *L. (L.) amazonensis* (MINSA, 2019). Estudios realizados del uso de la  $PcAlCl_4$ , *in vitro*, frente a promastigotes metacíclicos, tuvo un efecto toxico en *L. (V.) peruviana* y *L. (V.) braziliensis* de  $75,4 \mu m \pm 3,18$  y  $175,2 \mu m \pm 2,36$ , respectivamente, y de *L. (L.) amazonensis* de  $211,1 \mu m \pm 2,50$ ,  $93,27\% \pm 3,88$  y  $0,21 \mu m \pm 0.08$  de inhibición, estos resultados promueven el uso de estos FS aplicados en modelos murinos (*In vivo*) (Valdivieso *et al.*, 2008; Nesi-Reis *et al.*, 2018; Izarra, 2018).

Los resultados demuestran que el efecto fototóxico de la PcAICIS<sub>4</sub> irradiada a 675.5 nm, 50 J/cm<sup>2</sup>, en la zona afectada por amastigotes de *L. (L.) amazonensis*, tuvo un efecto positivo con la cicatrización de las zonas tratadas con un máximo de 15 semanas y, por último, luego de 12 semanas no se observó ninguna evidencia de alteración en la piel. Este FS tiene propiedades fotofísicas favoreciendo el rango de absorción, comportamiento selectivo al inhibir al parásito por apoptosis o necrosis luego de ser irradiado, gracias a su carácter hidrofílico, generador de oxígeno singlete y ser de baja toxicidad; también el uso de las lámparas LED beneficia la irradiación, ya que tiene propiedades como longitudes de onda altamente selectivas con el FS, con alta potencia en densidad y baja en el tiempo de tratamiento para no causar daños secundarios en la piel y ser localizado (Gmurek *et al.*, 2011; Amin *et al.*, 2012; Mordon *et al.*, 2012). El uso de la PcAICIS<sub>4</sub> en crema no presentó disminución de la induración y úlcera tras el uso de la TFD a comparación de la PcAICIS<sub>4</sub> en solución, este resultado puede ser debido a que la aplicación en crema es superficial y no hay contacto con el tejido conectivo donde se concentran los amastigotes y están en constante reproducción a comparación de la presentación en solución que penetra el tejido y por ende tiene más contacto con el parásito.

Estudios realizados por Hernández, 2010, de dos FS como la PcAISCI y la PcAICI aplicados *in vitro* en amastigotes axénicos de *L. (L.) amazonensis*, donde este último FS tuvo un mejor efecto fototóxico y así al aplicarlo de manera *in vivo* obtuvo un menor tiempo de curación y también sin lesiones adquiridas luego de doce semanas (postratamiento). La diferencia que menciona Hernández, tal vez se deba a la adición de sulfuros, ya que este producto debe de ser permeable y atravesar dos membranas (la membrana celular y la vacuola formada por el macrófago). La PcAICIS<sub>4</sub> utilizada en este trabajo al ser tetrasulfonada, el paso a través de estas dos membranas mencionadas; también Ospina (2014), menciona que esta familia de FS solo se retiene en la epidermis y dermis, el cual es adecuado ya que se elimina al desescamarse el

estrato corneo (queratina) haciendo más difícil y así el tiempo de curación sea más prolongado. (Hernández, 2010; Ospina *et al.*, 2014). El hámster dorado del grupo 2 (C1), al cual solo se le aplicó el FS, no se irradió y se mantuvo en oscuridad produjo resultados inesperados, ya que este FS al estar en oscuridad no debe de ser excitado y por ende no debe de formar el oxígeno singlete. Existe la posibilidad de que este suceso no se haya producido por la actividad del FS si no por el sistema inmunológico del hospedero, ya que en algunas ocasiones la LMC puede desaparecer de manera gradual, pudiendo durar meses o años y va a depender en muchas ocasiones de la especie y del tamaño de la lesión generando al final una cicatrización, pero puede estar presente de manera permanente en los fibroblastos (Martinez y Petersen, 2014; Khanna, 2016).

Generalmente *L. (L.) amazonensis* presenta manifestaciones clínicas inusuales, en este caso, el parásito realizó la manifestación de leishmaniasis mucocutánea reciente, ya que la extensión generada por la metástasis del parásito fue de tres meses y se evidenció con la inflamación desmesurada de las orejas, mucosa nasal, cola, pata anterior y posterior. Estas manifestaciones en los pacientes suelen ocurrir con el paso de los años, convirtiéndose en lesiones crónicas y que se expanden a través de todo el cuerpo a pesar de que se haya recibido tratamiento, el cual recibe el nombre de leishmaniasis mucocutánea reciente (menor de un año) o tardía (más de un año) (Sandoval-Juárez *et al.*, 2014).

El diagnóstico para verificar la presencia del parásito es mediante biopsias y coloreadas con hematoxilina-eosina. Esta técnica permite observar las estructuras celulares y tisulares afectadas por el parásito. La coloración H-E se basa en la acción de la hematoxilina que tiñe los núcleos y kinetoplasto de azul, morado o violeta y de contraste la eosina, que otorga diferentes tonalidades de rosados al citoplasma y otros componentes del tejido (Montalvo, 2010; Welsch y Sobotta, 2008). Con esta técnica histológica se logró observar en todas las muestras recolectadas, macrófagos

vacuolados indiferenciados, los cuales contenían en su interior numerosos amastigotes que deformaban la membrana del macrófago y acompañados también de una gran cantidad de células plasmáticas, evidenciando así la respuesta inmunológica del hospedero. Reyes (1993), Rodríguez (1994) y Handler *et al.*, (2015) observan, en cortes histológicos de pacientes con lesiones ulcerosas, la infiltración de macrófagos de gran tamaño e indiferenciados con una gran cantidad de células linfoides y plasmáticas, que son los que abundan en un desarrollo inflamatorio (Reyes,1993; Rodríguez *et al.*, 1994; Handler *et al.*, 2015). La *L. (L.) amazonensis* al ser considerada una enfermedad crónica puede generar alteraciones en la célula hospedera mediante vías de señalización generando así su supervivencia, es así que se observó en el corte histológico de la zona tratada abundantes amastigotes englobados en macrófagos a pesar de que se realizó la TFD con efectividad y no hubo una reaparición de lesiones o inflamación en la zona después de 12 semanas (Martínez y Petersen, 2014).

Diversos autores fomentan el uso de animales murinos como el *Mesocricetus auratus* (hámster dorado) a comparación de otros modelos como ratones, ratas, etc. En este modelo de infección las sintomatologías se manifiestan muy similares para los tres tipos de leishmaniasis (cutáneas, mucocutáneas y visceral), dando oportunidad de poder tener mejores resultados para la aplicación de este tipo de tratamiento localizado. También se promueve la inoculación de los parásitos en la zona sacro lumbar, debido a que en esta zona las manifestaciones de las lesiones son homogéneas y generan un mejor estado del animal sin alteraciones a comparación de la inoculación en otras zonas como la nariz o las patas, ya que en estas zonas la expresión de las sintomatologías son diferentes (aumento desmesurado de la zona), ya que en la nariz impide que se de una buena respiración y en las patas evita el pasaje de los alimentos hacia la boca (Travi *et al.*, 2002; Osorio *et al.*, 2003; Sinagra *et al.*,

2007; Hernandez, 2010; Peloi *et al.*, 2011; Robledo *et al.*, 2012; Rojas-Jaimes y Iannacone, 2015).

## VIII. CONCLUSIONES

- La aplicación de la Ftalocianina de aluminio tetrasulfonada clorada ( $\text{PcAlClS}_4$ ) actuó como un fotosensibilizador ideal, que al ser irradiado a 675.5 nm, 50 J/cm<sup>2</sup>, produjo la cicatrización de las lesiones ulcerosas.
- El uso de *Mesocricetus auratus* (hámster dorado) como modelo murino produjo los signos característicos de la leishmaniasis mucocutánea, muy similares a los signos producidos en los pacientes que lo padecen.
- La  $\text{PcAlClS}_4$  en solución obtuvo un mejor resultado, ya que al final del tratamiento se logró obtener una cicatrización adecuada al finalizar el tratamiento a comparación de la  $\text{PcAlClS}_4$  en crema, del cual tanto la induración como la úlcera seguían en aumento.
- No se generó lesiones luego de doce semanas (Pos-Tratamiento) en la zona infectada; pero al mismo tiempo se produjo la metástasis de *Leishmania (L.) amazonensis* producto del alto grado de diseminación y agresividad de este parásito. Por su capacidad migratoria característico de esta especie.

## IX. RECOMENDACIONES

- Se debe continuar con este tipo de tratamiento posteriormente aplicado a lesiones cutáneas localizadas producidas por ejemplo por *Leishmania (Viannia) peruviana*.
- Se debe evaluar diferentes formulaciones como las nanopartículas, películas, etc., para una mejor selectividad del fotosensibilizador.
- Se debe evaluar la PcAlCl, debido a que en una investigación obtuvieron un menor tiempo de curación con el mismo patógeno de la misma especie.

## X. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- ALLISON Ron, DOWNIE Gordon, CUENCA Rosa, HU Xin.-Hua, CHILDS Carter, SIBATA Claudio. Photosensitizers in Clinical PDT. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. 2004, vol. 1, n° 1, p. 27-42. ISSN 1572-1000.
- ALRAJHI Abdulrahman, IBRAHIM Elfaki, DE VOL Edward, KHAIRAT Mohammad, FARIS Rajab, MAGUIRE James. Fluconazole for The Treatment of Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania Major*. 2002, vol. 346, n°. 12, p. 891-895. ISSN 0028-4793.
- AMIN Rehab, HAUSER Carmen, KINZLER Ingrid, RUECK Angelika, SCALFI-HAPP, Claudia. Evaluation of Photodynamic Treatment Using Aluminum Phthalocyanine Tetrasulfonate Chloride as a Photosensitizer: New Approach. Photochemical & Photobiological Sciences: Official Journal of The European Photochemistry Association and The European Society for Photobiology. 2012, vol. 11, n°. 7, p. 1156-1163. ISSN 1474-9092 1474-905X.
- ARONSON, Naomi, HERWALDT Barbara, LIBMAN Michael, PEARSON Richard, LOPEZ-VELEZ Rogelio, WEINA Peter, CARVALHO Edgar, EPHROS Moshe, JERONIMO Selma, MAGILL Alan. Diagnosis and Treatment of Leishmaniasis: Clinical Practice Guidelines by The Infectious Diseases Society of America (Idsa) and The American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH). *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2017, vol. 96, n°. 1, p. 24-45. ISSN 0002-9637.
- AURELIANO Debora, RIBEIRO Martha, LAULETTALINDOSO José, POGLIANI Fabio, SELLERA Fabio, BAPTISTA Dennis. *Treatment and Control of Leishmaniasis Using Photodynamic Therapy. Leishmaniasis - Trends in Epidemiology, Diagnosis and Treatment*. 2014. DOI 10.5772/57456.
- BATES P. The Developmental Biology of Leishmania Promastigotes. *Experimental Parasitology*. 1994, vol. 79, n° 2, p. 215-218. ISSN 0014-4894. DOI 10.1006/EXPR.1994.1084.
- BATES P. Revising Leishmania's Life Cycle. *Nature Microbiology*. 2018, vol. 3, n° 5, p. 529-530. ISSN 2058-5276. DOI 10.1038/S41564-018-0154-2.
- BEN-HUR Ehud, ROSENTHAL Ionel. The Phthalocyanines: a New Class of Mammalian Cells Photosensitizers with a Potential for Cancer Phototherapy. *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry, And Medicine*. 1985. vol. 47, p. 145-477. DOI 10.1080/09553008514550211.
- BUCKNER Frederick and SCHWARTZ Eli. 2017. Leishmaniasis. EN: SANFORD, Christopher, POTTINGER, Paul and JONG, Elaine (edit.). *The Travel and Tropical Medicine Manual (Fifth edition)*. S.L.: ELSEVIER. 2017, p. 501-512. ISBN 978-0-323-37506-1.
- BURSTEIN Zuño, GUILLÉN Alfredo. Leishmaniasis Cutánea y Mucocutánea (CIE-10 B55 1-B55-2) \* En el Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 2002, vol. 19, n° 4, p. 215-218. ISSN 1726-4642.

- CÁCERES Abraham. Especies de *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) Vectores de la "Uta" en el Perú. *Revista Peruana de Entomología*. 1996, vol. 38, n° 1, p. 19-23.
- CAMPOS SALINAS, Jenny Karina. "Caracterización de las Proteínas LABCG1 y LABCG5 de *Leishmania*: Implicación en el Tráfico Intracelular de Hemo y en la Infección de Macrófagos". ASESOR: Enrique García Olivares. Tesis DOCTORAL. UNIVERSIDAD DE GRANADA, Granada, 2008.
- CAÑEDA Isabel, LOZANO Yokomi, BERZUNZA Miriam, AGUIRRE Magdalena, GUTIÉRREZ Ingeborg. *Leishmaniosis: Vectores*. Ensayo. Universidad Nacional Autónoma De México, Facultad De Ciencias. 2017, vol. 68 n°1.
- CAPPUGI P., CAMPOLMI P., MAVILIA L., PRIGNANO F., ROSSI R. Topical 5-Aminolevulinic Acid and Photodynamic Therapy in Dermatology: A Minireview. *Journal of Chemotherapy (Florence, Italy)*. 2001, vol. 13, n°5, p. 494-502. ISSN 1120-009X 1120-009X. DOI 10.1179/JOC.2001.13.5.494.
- Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades y Ministerio De Salud. Boletín Epidemiológico del Perú. 2018, vol. 27, p. 294-298. ISSN 2415-076 2.
- Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades y Ministerio de Salud. Casos de Leishmaniasis, PERÚ 2000 – 2019\*. 2019.
- COBO Fernando. *Leishmaniasis*. EN: COBO Fernando (edit.), *Imported Infectious Diseases*. S.L.: Woodhead Publishing. 2001, p. 227-242. ISBN 978-1-907568-57-2.
- DAI Tianhong, FUCHS Beth, COLEMAN Jeffrey, PRATES Renato, ASTRAKAS Christos, St. DENIS Tyler, RIBEIRO Martha, MYLONAKIS Eleftherios, HAMBLIN Michael, TEGOS George. Concepts and Principles of Photodynamic Therapy as an Alternative Antifungal Discovery Platform. *Frontiers in Microbiology*. 2012, vol. 3. ISSN 1664-302X. DOI:10.3389/FMICB.2012.00120.
- DANIELL M., HILL J. A History of Photodynamic Therapy. *Australian and New Zealand Journal of Surgery*. 1991, vol. 61, n°5, p. 340-348. ISSN 0004-8682. DOI 10.1111/J.1445-2197.1991.TB00230.X.
- DETTY Michael, GIBSON Scott, WAGNER Stephen. Current Clinical and Preclinical Photosensitizers for Use in Photodynamic Therapy. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2004, vol. 47, n°16, p. 3897-3915. ISSN 0022-2623. DOI 10.1021/JM040074B.
- DURGUT Tuğçe. "Photosensitizers for Photodynamic Action and Synthesis of Modules for a Molecular Demultiplexer". Asesor: Engin Umut Akkaya. Tesis Magister en Ciencia. The Graduate School, 2014.
- EPHROS Moshe, ARONSON Naomi. *Leishmania Species (Leishmaniasis)*. EN: LONG Sarah, PROBER Charles, FISCHER Marc (edit.), *Principles And Practice Of Pediatric Infectious Diseases (Fifth Edition)*. 2018, p. 1323-1334. ISBN 978-0-323-40181-4.
- ESCOBAR Patricia, HERNANDEZ Indira, RUEDA Cesar, MARTINEZ Fernando, PAEZ Edgar. Photodynamic Activity of Aluminium (III) and Zinc (II) Phthalocyanines In



Leishmania Promastigotes. Biomedica: *Revista del Instituto Nacional de Salud*. 2006, vol. 26, p. 49-56. ISSN 0120-4157 0120-4157.

FERNÁNDEZ RUBIO Celia. Potencial Terapéutico y Toxicidad de Inhibidores de Topoisomerasas como Antiparasitarios. Asesores: Yolanda Pérez Pertejo, Rosa Reguera Torres. Tesis Doctoral. Universidad De León, León, 2010.

FRÉZARD Frédéric, DEMICHELI Cynthia, RIBEIRO Raul. Pentavalent Antimonials: New Perspectives for Old Drugs. 2009, vol. 14, n°7, p. 2317-2336. DOI 10.3390/MOLECULES14072317.

GAMBOA Dionicia, TORRES Katherine, DEDONCKER Simonne, ZIMIC Mirko, AREVALO Jorge, DUJARDIN J-C. Evaluation of an *In Vitro* and *In Vivo* Model for Experimental Infection with *Leishmania (Viannia) Braziliensis* and *L. (V.) Peruviana*. 2008, vol. 135, p. 319-26. DOI 10.1017/S0031182007003848.

GMUREK Marta, KUBAT Pavel, MOSINGER Jiri, MILLER Jacek. Comparison of Two Photosensitizers Al (III) Phthalocyanine Chloride Tetrasulfonic Acid and Meso-Tetrakis (4-Sulfonatophenyl) Porphyrin in The Photooxidation of N-Butylparaben. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 2011, vol. 223, n°1, p. 50-56. ISSN 1010-6030. DOI 10.1016/J.JPHOTOCHEM.2011.07.015.

GOLD Michael. History of Photodynamic Therapy. En: GOLD Michael (Edit.), Photodynamic Therapy in Dermatology. New York, Ny: Springer New York. 2011, p. 1-4. ISBN 978-1-4419-1298-5. DISPONIBLE EN: [HTTPS://DOI.ORG/10.1007/978-1-4419-1298-5\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1298-5_1).

HANDLER Marc, PATEL Parimal, KAPILA Rajendra, AI-QUBATI Yasin, SCSHWARTZ Robert. Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis: Differential Diagnosis, Diagnosis, Histopathology, and Management. *Journal of The American Academy of Dermatology*. 2015, vol. 73, n°6, p. 911-926. ISSN 0190-9622. DOI 10.1016/J.JAAD.2014.09.014.

HENAO Héctor, OSORIO Yaneth, SARAVALA Nancy, GÓMEZ Arlen, TRAVI Bruno. Eficacia y Toxicidad de los Antimoniales Pentavalentes (Glucantime® y Pentostam®) en un Modelo Animal de Leishmaniasis Cutánea Americana: Aplicación de la Luminometría. *Biomédica*. 2004, vol. 24, p. 393-402. ISSN 0120-4157.

HERNANDEZ PEÑARANDA Indira Paola. "Actividad Fototóxica *In Vitro* e *In Vivo* de Ftalocianina de Aluminio Clorada Contra *Leishmania Amazonensis*". Asesor: Sara Robledo Restrepo. Tesis de Grado. Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, 2010.

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD. Leishmaniasis. Lima, Perú, 2000.

ISNARD Amandine, SHIO Marina, OLIVIER Martin. Impact of Leishmania Metalloprotease Gp63 on Macrophage Signaling. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2012, vol. 2. ISSN 2235-2988. DOI 10.3389/FCIMB.2012.00072.

ISSA María and MANELA Mónica. Photodynamic Therapy: A Review of The Literature and Image Documentation. Río De Janeiro, Brasil: S.N., 2010, p. 501-511.

- IZARRA ROJAS Kelly Vanessa. "Actividad Fotodinámica *In Vitro* de Ftalocianina de Aluminio Tetrasulfonada Clorada (Alpccls4) Frente a Estadios Extracelular e Intracelular de *Leishmania* (*Viannia*) *Peruviana*, *L. (V.) Braziliensis* y *L. (Leishmania) Amazonensis*". Asesores: Jorge León Quispe, Nyshon Rojas Palomino. Tesis Título Profesional. UNMSM,EP Ciencias Biológicas, Lima, 2018.
- JOSEFSEN Leanne, BOYLE Ross. Photodynamic Therapy and The Development of Metal-Based Photosensitisers. Metal-Based Drugs. 2008, vol. 8, p. 276109-276109. ISSN 0793-0291. DOI 10.1155/2008/276109. PUBMED: 18815617
- KAYE Paul, SCOTT Philip. Leishmaniasis: Complexity at The Host-Pathogen Interface. Nature Reviews. Microbiology. 2011, vol. 9, n°8, p. 604-615. ISSN 1740-1534 1740-1526. DOI 10.1038/NRMICRO2608.
- KEVRIC Ines, CAPPEL Mark, KEELING James. New World and Old World Leishmania Infections: A Practical Review. Dermatologic Clinics. 2015, vol. 33, n°3, p. 579-593. ISSN 1558-0520 0733-8635. DOI 10.1016/J.DET.2015.03.018.
- KHANNA Priyanka. Leishmaniasis Cutánea. Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica LXXIII. 2016, vol. 73, n°618, PP. 17-21.
- KUHLMANN Matthew and FLECKENSTEIN James. Antiparasitic Agents. En: Cohen Jonathan, Powderly William, Opal Steven (Edit.), Infectious Diseases (Fourth Edition). S.L.: ELSEVIER. 2017, p. 1345-1372.E2. ISBN 978-0-7020-6285-8.
- KUONEN Francois, GAIDE Oliver. Nouvelle Lumière Sur La Thérapie Photodynamique Cutanée [New Light on Skin Photodynamic Therapy]. Revue Medicale Suisse. 2014, vol. 10, n°424, p. 754,756-759. ISSN 1660-9379.
- KWIATKOWSKI Stanislaw, KNAP Bartosz, PRZYSTUPSKI Dawid, SACZKO Jolanta, KĘDZIERSKA Ewa, KNAP-CZOP Karolina, KOTLIŃSKA Jolanta, MICHEL Olga, KOTOWSKI Krzysztof, KULBACKA Julita. Photodynamic Therapy - Mechanisms, Photosensitizers and Combinations. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2018, vol. 106, p. 1098-1107. ISSN 0753-3322. DOI 10.1016/J.BIOPHA.2018.07.049.
- LEDVANCE. SAVOIR-FAIRE LEDVANCE: LES TEINTES DE COULEUR DES LED. 2019. DISPONIBLE EN: [HTTPS://WWW.LEDVANCE.FR/PRODUITS/CONNAISSANCE-DES-PRODUITS/BASES-LED/COULEURS-DE-LA-LUMIERE-LED/INDEX.JSP](https://www.ledvance.fr/produits/connaissance-des-produits/bases-led/couleurs-de-la-lumiere-led/index.jsp).
- LÓPEZ L., PALACIO M., CARDONA J. Eficacia de los Azoles en el Tratamiento de la Leishmaniasis Cutánea. Archivos de Medicina. 2016, vol. 12, n°2, p. 10. ISSN 1698-9465. DOI 10.3823/1289.
- LOZANO JIMÉNEZ Yenny Yolanda. "Estudio de un Canal de Cloruro de Leishmania y su Importancia en la Fisiología del Parásito". Asesores: María Camacho Navarro, Claudio Gómez Alegría. Tesis Doctoral. Universidad Nacional De Colombia, Bogotá, Colombia, 2011.
- MANJÓN Amallobieta Félix. "Síntesis y Propiedades Fotofísicas de Sistemas Ftalocianina Perilenodiimida Conjugados y No Conjugados para su Estudio como Sistema Fotosintético Artificial". Asesor: Ángela Sastres Santos. Tesis de Grado. 2016.

- MARTINEZ Pedro, PETERSEN Christine. Chronic Infection by *Leishmania Amazonensis* Mediated Through MAPK ERK Mechanisms. Immunologic Research. 2014, vol. 59, p. 153-165. ISSN 0257-277X. DOI 10.1007/S12026-014-8535-Y.
- MINISTERIO DE SALUD. Boletín Epidemiológico del Perú. 2019, vol. 28, p. 307-333. ISSN 2415-076 2.
- MONTALVO ARENAS César Eduardo. Técnica Histológica. 2010.
- MORDON S., MARTÍNEZ-CARPIO P., VÉLEZ M., ALVES R., TRELLES M. Terapia Fotodinámica (PDT) en Piel y Estética: Procedimiento, Materiales y Método en Base a Nuestra Experiencia. En: Cirugía Plástica Ibero-Latinoamericana. 2012, vol. 38, p. 287-295. ISSN 0376-7892.
- MORENO Gerardo, ENG Argelia, ALVARADO Araceli, CAMPS-FRESNEDA Alejandro. Terapia Fotodinámica. 2007, vol. 35, n°6, p. 255-268.
- MORO Mario Mayor. "Avances en La Terapia Oral De La Leishmaniasis". Asesor: Francisco Bolás Fernández. Tesis de Grado. Universidad Complutense de Madrid. 2016.
- MUKHOPADHYAY Sumi, MANDAL Chitra. Glycobiology of *Leishmania Donovanii*. The Indian Journal of Medical Research. 2006, vol. 123, n°3, p. 203-220. ISSN 0971-5916.
- MUSKUS Carlos, MARÍN-VILLA Marcel. Metaciclologénesis: Un Proceso Fundamental en la Biología de Leishmania. 2002.
- NESI-REIS V., NAVASCONI T.R., LERA-NOSONE D.L., OLIVEIRA E.L., BARBOSA P.M., CAETANO W., SILVEIRA T.G.V., ARISTIDES S.M.A., HIOKA N., LONARDONI, M.V. Phototoxic Effect of Aluminium-Chlorine and Aluminium-Hydroxide Phthalocyanines on *Leishmania (L.) Amazonensis*. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. 2018, vol. 21, p. 239-245. ISSN 1873-1597 1572-1000. DOI 10.1016/J.PDPDT.2017.12.008.
- NGUEWA Paul, FUERTES Miguel, CEPEDA, Victoria, IBORRA Salvador, CARRIÓN Javier, VALLADARES Basilio, ALONSO Carlos, PÉREZ José. Pentamidine is an Antiparasitic and Apoptotic Drug That Selectively Modifies Ubiquitin. Chemistry & Biodiversity. 2005, vol. 2, n°10, p. 1387-1400. ISSN 1612-1880. DOI 10.1002/CBDV.200590111.
- NIEVES Elsa, RONDÓN Maritza. Metaciclologénesis y Desarrollo de *Leishmania (Leishmania) Amazonensis* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) en *Lutzomyia Ovallesi* (Diptera: Psychodidae). Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. 2010, vol. 30, n° 2, p. 121-127. ISSN 1317-973X.
- OLIVIER Martin, ATAYDE Vanessa, ISNARD Amandine, HASSANI Kasra, SHIO Marina. Leishmania Virulence Factors: Focus on The Metalloprotease Gp63. Microbes and Infection. 2012, vol. 14, n°15, p. 1377-1389. ISSN 1769-714X 1286-4579. DOI 10.1016/J.MICINF.2012.05.014.
- ONISZCZUK Anna, WOJTUNIK-KULESZA Karolina, ONISZCZUK Tomasz, KASPRZAK Kamila. The Potential of Photodynamic Therapy (PDT). Experimental Investigations and Clinical Use. Biomedicine & Pharmacotherapy.

2016, vol. 83, p. 912-929. ISSN 0753-3322. DOI 10.1016/J.BIOPHA.2016.07.058.

O'RIORDAN Katie, AKILOV Oleg, HASAN Tayyaba. The Potential for Photodynamic Therapy in The Treatment of Localized Infections. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. 2005, vol. 2, n°4, p. 247-262. ISSN 1572-1000. DOI 10.1016/S1572-1000(05)00099-2.

OSORIO Yaneth, MELBY Peter, PIRMEZ Claude, CHANDRASEKAR Bysani, GUARIN Nora, TRAVI Bruno. The Site of Cutaneous Infection Influences The Immunological Response and Clinical Outcome of Hamsters Infected with *Leishmania Panamensis*. Parasite Immunology. 2003, vol. 25, n°3, p. 139-148. ISSN 0141-9838 0141-9838.

OSPINA Victoria, MANTILLA Julio, CONDE Carlos, ESCOBAR Patricia. Permeación en Piel Humana de una Nanoemulsión de Ftalocianina de Aluminio Clorada para la Optimización de Tratamientos Tópicos de Leishmaniasis Cutánea. *Revista Ciencias de La Salud*. 2014, vol. 12, n°2. DOI 10.12804/REVSALUD12.2.2014.05.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION / WORLD HEALTH ORGANIZATION (PAHO/WHO). Plan of Action to Strengthen The Surveillance and Control of Leishmaniasis in The Americas 2017-2022. 2017.

PELOI Lilian, BIONDO Carlos, KIMURA Elza, POLITI Mario, LONARDONI María, ARISTIDES Sandra, DOREA Regina, HIOKA Noboru, SILVEIRA Thais. Photodynamic Therapy for American Cutaneous Leishmaniasis: The Efficacy of Methylene Blue in Hamsters Experimentally Infected with *Leishmania (Leishmania) Amazonensis*. Experimental Parasitology. 2011, vol. 128, n°4, p. 353-356. ISSN 1090-2449 0014-4894. DOI 10.1016/J. EXPPARA.2011.04.009.

PÉREZ PÉREZ Fabián. "Actualidad y Perspectivas en el Tratamiento Tópico y Local de la Leishmaniasis Cutánea". Asesor: Francisco Bolás Fernández. tesis de grado. Facultad De Farmacia, Universidad Complutense. 2016.

PINEDA-REYES Roberto, LLANOS-CUENTAS Alejandro, DANCUART Mauricio. Tratamientos Tradicionales Utilizados en un Área Endémica de Leishmaniasis Cutánea en el Perú. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública. 2015, vol. 32, p. 761-765. ISSN 1726-4634.

PONTE-SUCRE Alicia, SCHARNER Anabel, MOLL Heidrun. El Lipofosfoglicano de *Leishmania Major* Modula la Expresión de Receptores Involucrados en la Internalización del Parásito en Células de Langerhans de la Piel. Acta Científica Venezolana. 2012, vol. 53, n°3, p. 218-224. ISSN 0001-5504.

REITHINGER Richard, DUJARDIN Jean, LOUZIR Hechmi, PIRMEZ Claude, ALEXANDER Bruce, BROOKER Simon. Cutaneous Leishmaniasis. The Lancet Infectious Diseases. 2007, vol. 7, n°9, p. 581-596. ISSN 1473-3099. DOI 10.1016/S1473-3099(07)70209-8.

REYES Flores Oscar. Histopatología de la Leishmaniasis. Dermatología Venezolana. 1993, vol. 31. ISSN 2343-5755.

ROBLEDO Sara, CARRILLO Lina, DAZA Alejandro, RESTREPO Adriana, MUÑOZ Diana, TOBÓN Jairo, MURILLO Javier, LÓPEZ Anderson, RÍOS Carolina,

- MESA Carol, UPEGUI Yulieth, VALENCIA-TOBÓN Alejandro, MONDRAGÓN-SHEM Karina, RODRÍGUEZ Berardo, VÉLEZ Iván. Cutaneous Leishmaniasis in the Dorsal Skin of Hamsters: A Useful Model for the Screening of Antileishmanial Drugs. *Journal of Visualized Experiments: Jove*. 2012, n°62, p. 3533. ISSN 1940-087X. DOI 10.3791/3533. PUBMED: 22546739
- RODRÍGUEZ, G., SARMIENTO, L. Y HERNÁNDEZ, C.A. Leishmaniasis Mucosa y Otras Lesiones Destructivas Centofaciales\*. *Biomédica: Revista del Instituto Nacional de Salud*. 1994, vol. 14, p. 215-229. DOI 10.7705/BIOMEDICA.V14I4.2108.
- RODRÍGUEZ MONTILLA Luis Miguel. "Efecto De Extractos Metanólicos de Semillas de *Carica Papaya* sobre Promastigotes de *Leishmania Mexicana*. Asesor: Concepción Hernández China. Tesis De Grado. Universidad Central De Venezuela, Caracas, Venezuela, 2015.
- ROELANDTS Rik. The History of Phototherapy: Something New Under The Sun? *Journal of The American Academy of Dermatology*. 2002, vol. 46, n°6, p. 926-930. ISSN 0190-9622. DOI 10.1067/MJD.2002.121354.
- ROJAS-JAIMES Jesús, IANNAONE José. Infection by *Leishmania Spp.* In the Hamster *Mesocricetus Auratus* Using Promastigotes Cultured *In Vitro*. *The Biologist (Lima)*. 2015, vol. 13, n°2. ISSN 1994-9073.
- ROSAL T., BAQUERO-ARTIGAO F., GARCÍA M. Leishmaniasis Cutánea. *Pediatría Atención Primaria*. 2010, vol. 12, p. 263-271. ISSN 1139-7632.
- RUEDA Jonathan, SANTOS Mario, MANTILLA David, PINILLA Araceli, DIAZ María, VERA Angélica, CARREÑO Heider, MANTILLA Julio, ESCOBAR Patricia. Transferosomas Conteniendo Ftalocianina de Aluminio Clorada como Alternativa Terapéutica en Leishmaniasis Cutánea: Permeabilidad y Biodistribución en Ratas Wistar. *Revista Científica Salud Uninorte*. 2018, vol 34, n°2.
- RYAN Edward. Antiparasitic Agents. En: LONG Sarah, PROBER Sarah y FISCHER Marc (Edit.), *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases (Fifth Edition)*. 2018. S.L.: ELSEVIER, PP. 1567-1587.E2. ISBN 978-0-323-40181-4.
- SACK Harald. NIELS RYBERG FINSSEN AND THE PHOTOTHERAPY. *SCIHI BLOG*. 2015. DISPONIBLE EN: [HTTP://SCIHI.ORG/NIELS-RYBERG-FINSSEN-AND-THE-PHOTOTHERAPY/](http://SCIHI.ORG/NIELS-RYBERG-FINSSEN-AND-THE-PHOTOTHERAPY/).
- SALAZAR GOMIS Manuel. Síntesis y Caracterización de Ftalocianinas de Silicio Como Precursores de Fármacos para Terapia Fotodinámica Contra el Cáncer. 2015.
- SÁNCHEZ Elena, SÁENZ Eliana, PANCORBO Julia, ZEGARRA DEL CARPIO Robert, GARCÉS Norma, REGIS Alberto. Leishmaniasis. *Dermatología Peruana*. 2004, vol. 14, n°2, p. 82-98.
- SANDOVAL Aidé, MINAYA Gloria, ROJAS Nyshon, FALCONI Eduardo, CÁCERES Omar. Leishmaniosis Cutánea: Manifestación Clínica Inusual. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 2014, vol. 31, n°3. ISSN 1726-4642. DOI 10.17843/ RPMESP.2014.313.100.

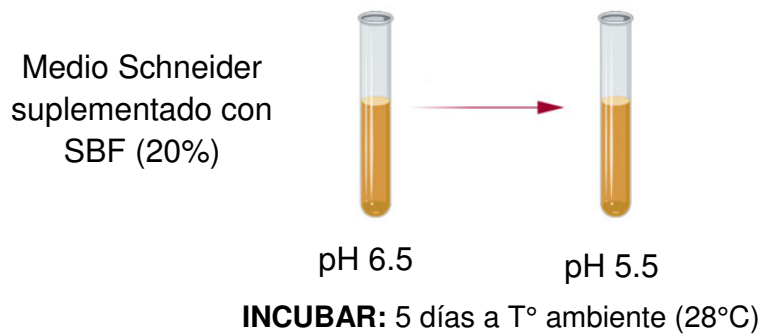
- SHARMAN Wesley, ALLEN Cynthia Y VAN LIER Johan. Photodynamic Therapeutics: Basic Principles and Clinical Applications. Drug Discovery Today. 1999, vol. 4, n° 11, Pp. 507-517. ISSN 1878-5832 1359-6446.
- SINAGRA Angel, LUNA Concepción, ABRAHAM David, IANNELLA María, RIARTE Adelina, KROLEWIECKI Alejandro. The Activity of Azithromycin Against *Leishmania (Viannia) Braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) Amazonensis* in the Golden Hamster Model. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2007, vol. 40, n°6, p. 627-630. ISSN 0037-8682 0037-8682.
- SINGH Nisha, KUMAR Manish, SINGH Rakesh. Leishmaniasis: Current Status of Available Drugs and New Potential Drug Targets. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine. 2012, vol. 5, n° 6, PP. 485-497. ISSN 2352-4146 1995-7645. DOI 10.1016/S1995-7645(12)60084-4.
- SINGH Sarman, SIVAKUMAR Ramu. Challenges and New Discoveries in the Treatment of Leishmaniasis. Journal of Infection and Chemotherapy. 2004, vol. 10, n° 6, p. 307-315. ISSN 1341-321X. DOI 10.1007/S10156-004-0348-9.
- SPATH Gerald, BEVERLEY Stephen. A Lipophosphoglycan Independent Method for Isolation of Infective *Leishmania* Metacyclic Promastigotes by Density Gradient Centrifugation. Experimental Parasitology. 2001, vol. 99, n° 2, p. 97-103. ISSN 0014-4894 0014-4894. DOI 10.1006/EXPR.2001.4656.
- SUNTER Jack, GULL Keith. Shape, Form, Function and *Leishmania* Pathogenicity: from Textbook Descriptions to Biological Understanding. Open Biology. 2017, vol. 7, n° 9, p. 13. ISSN 2046-2441. DOI 10.1098/RSOB.170165.
- TAPPEINER H., JODLBAUER A. Die Sensibilisierende Wirkung Fluoreszierender Substanzen; Gesammelte Untersuchungen Über Die Photodynamische Erscheinung. 1907. OCLC: 14803066.
- TAYLOR Viviana, CEDEÑO David, ROBLEDO Sara. Fototerapia para el Tratamiento de la Leishmaniasis Cutánea. Infectio. 2011, vol. 15, n° 4, p. 277-288. ISSN 01239392. DOI 10.1016/S0123-9392(11)70742-1.
- TEIXEIRA Dirceu, BENCHIMOL Marlene, RODRIGUES Juliany, CREPALDI Paulo, PIMENTA Paulo, DE SOUZA Wanderley. The Cell Biology of *Leishmania*: How to Teach Using Animations. *Plos Pathogens*. 2013, vol. 9, n° 10. ISSN 1553-7374 1553-7366. DOI 10.1371/JOURNAL.PPAT.1003594.
- TORRE Gema, CEBADA Tomás, MORGADE María. Las Ftalocianinas y sus Singulares Propiedades Electrónicas. Anales de la Real Sociedad Española de Química. 2003, n° 2, p. 84-98. ISSN 1575-3417.
- TORRES-GUERRERO Edoardo, QUINTANILLA-CEDILLO Marco, RUIZ-ESMENJAUD Julieta, ARENAS Roberto. Leishmaniasis: A Review. 2017, vol. 6, p. 750-750. ISSN 2046-1402. DOI 10.12688/F1000RESEARCH.11120.1. PUBMED: 28649370.
- TRAVI Bruno, OSORIO Yaneth, MELBY Peter, CHANDRASEKAR Bysani, ARTEAGA Lourdes, SARAIVA Nancy. Gender is a Major Determinant of the Clinical Evolution and Immune Response in Hamsters Infected with *Leishmania Spp*. Infection and Immunity. 2002, vol. 70, n° 5, p. 2288-2296. ISSN 0019-9567 0019-9567.

- VALDIVIESO Wilfredo, HERNANDEZ Indira, MARTÍNEZ Fernando, PAEZ Edgar, ESCOBAR Patricia. Efecto Fototóxico de la Terapia Fotodinámica en Promastigotes De *Leishmania Amazonensis*. 2008, vol. 40. p. 1-13.
- VICENTINI C., TYLCZ J.B., MAIRE C., MORDON S., MORTIER L. Terapia Fotodinámica. Emc - Dermatología. 2017, vol. 51, nº 3, p. 1-8. ISSN 1761-2896. DOI 10.1016/S1761-2896(17)85934-3.
- VILLA PULGARÍN Janny Alexander. "Nuevas Estrategias para el Tratamiento de la Leishmaniasis: Mecanismo de Acción de Lípidos Antitumorales, Interacción Hospedero-Parásito, y su Posible Utilidad Terapéutica". Asesor: Faustino Mollinedo García. Tesis Doctoral. Universidad De Salamanca. Salamanca, 2014.
- WELSCH Ulrich, SOBOTTA Johannes. Histología. S.L.: Ed. Médica Panamericana. 2008. ISBN 978-84-9835-178-1.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of The Leishmaniasis: Report of a Meeting of the Who Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. Control of the Leishmaniasis: Report of a Meeting of the Who Expert Committee on The Control of Leishmaniasis. 2010. ISBN 92-4-120949-6.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leishmaniasis. 2019. DISPONIBLE EN: [HTTPS://WWW.WHO.INT/NEWS-ROOM/FACT-SHEETS/DETAIL/LEISHMANIASIS](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis).
- ZORRILLA Víctor, VÁSQUEZ Gissella, ESPADA Liz, RAMÍREZ Pablo. Vectores de la Leishmaniasis Tegumentaria y la Enfermedad de Carrión en el Perú: Una Actualización. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública. 2017, vol. 34, nº 3, p. 485-496. ISSN 1726-4642 1726-4634. DOI 10.17843/RPMESP.2017.343.2398.

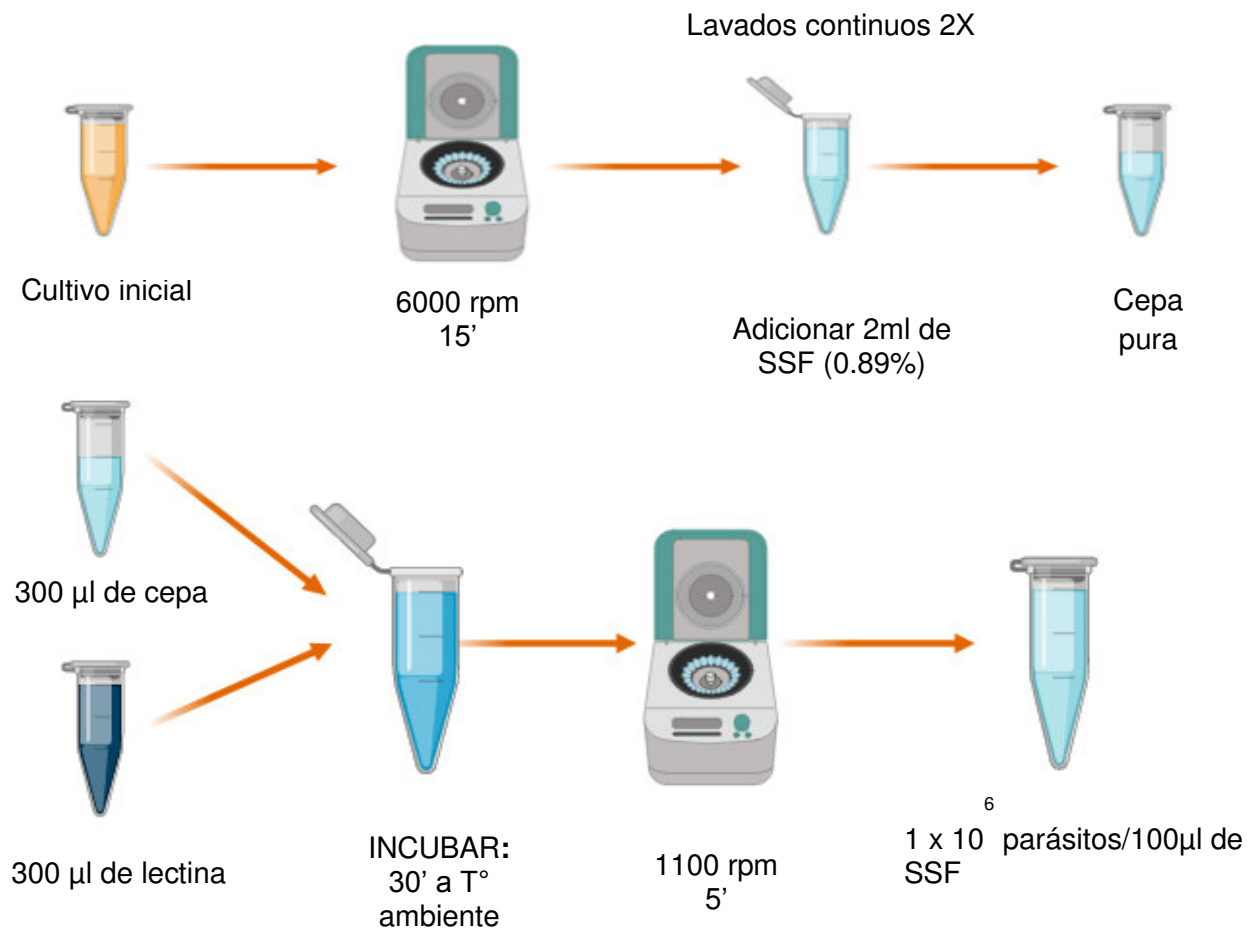
## ANEXO

### ANEXO 1. PROTOCOLO DE INDUCCIÓN A METACÍCLICOS Y PURIFICACIÓN CON LECTINA.

#### 1. INDUCCIÓN A METACÍCLICOS



#### 2. PURIFICACIÓN CON LECTINA





## ANEXO 2. CARTA APROBADA DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA-UNMSM



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**  
Universidad del Perú, Decana de América  
**Facultad de Medicina**  
**Comité de Ética en Investigación**  
*"Año de la lucha contra la corrupción y la impunidad"*



ACTA N°. 19-0038

CÓDIGO DE PROYECTO: N°.0038

### ACTA DE EVALUACIÓN ÉTICA

En Lima, a los cinco días del mes de junio de 2019, se realizó la **revisión ética expeditiva** de las recomendaciones Metodológicas y Éticas incorporadas como sugerencias de corrección al proyecto: **"Efecto de la terapia fotodinámica en el tratamiento con ftalocianina de AL (III) tetrasulfonada (PcAICIS<sub>4</sub>) sobre amastigotes de (Leishmania) amazonensis en mesocricetus auratus (HAMSTER DORADO)"**, presentada por la tesista, Carolina Medaly Quispe Soto, ha cumplido satisfactoriamente.

"El presente documento tiene vigencia a partir de la fecha y expira el 04 de junio del 2020"

### RESULTADO: PROYECTO APROBADO

  
Dr. RICARDO TERUKINA TERUKINA  
Presidente  
del Comité de Ética de Investigación

Lima, 05 de junio del 2019

**ANEXO 3. Medidas de las induraciones e úlceras durante las sesiones al aplicar  $\text{PcAlCl}_4$  e irradiados a 675.5 nm.**

**Tabla 5.** Medidas de las heridas y úlceras de la zona sacro lumbar con  $\text{PcAlCl}_4$  en crema e irradiadas a 675.5 nm.

Sesiones	Induración (mm)	Herida (mm)
1	0.68	0.33
2	0.68	0.34
3	0.7	0.34
4	0.71	0.35
5	0.73	0.35
6	0.76	0.37
7	0.77	0.42
8	0.79	0.42
9	0.8	0.41

**Tabla 6.** Medidas de las heridas y úlceras de la zona sacro lumbar del ejemplar A con  $\text{PcAlCl}_4$  en solución e irradiadas a 675.5 nm.

Sesiones	Induración (mm)	Herida (mm)
1	0.49	0.33
2	0.51	0.35
3	0.53	0.38
4	0.5	0.33
5	0.44	0.3
6	0.34	0.24
7	0	0.18
8	0	0

**Tabla 7.** Medidas de las heridas y úlceras de la zona sacro lumbar del ejemplar B con  $\text{PcAlClS}_4$  en solución e irradiadas a 675.5 nm.

Sesiones	Induración (mm)	Úlcera (mm)
1	0.75	0.2
2	0.78	0.25
3	0.83	0.31
4	0.86	0.28
5	0.92	0.25
6	0.91	0.21
7	0.81	0.19
8	0.72	0.14
9	0.63	0.11
10	0.54	0.09
11	0.33	0.05
12	0	0

**Tabla 8.** Medidas de las heridas y úlceras de la zona sacro lumbar del ejemplar C con  $\text{PcAlClS}_4$  e irradiadas a 675.5 nm.

Sesiones	Induración (mm)	Úlcera (mm)
1	0.91	0.34
2	0.91	0.38
3	0.89	0.35
4	0.94	0.44
5	1.2	0.54
6	1.16	0.56
7	1.17	0.58

<b>8</b>	1.15	0.56
<b>9</b>	1.12	0.51
<b>10</b>	0.97	0.48
<b>11</b>	0.9	0.43
<b>12</b>	0.76	0.4
<b>13</b>	0.73	0.39
<b>14</b>	0.66	0.35
<b>15</b>	0.64	0.3
<b>16</b>	0.55	0.24
<b>17</b>	0.5	0.2
<b>18</b>	0.34	0.14
<b>19</b>	0.26	0.1
<b>20</b>	0.12	0.06
<b>21</b>	0	0

## COMPOSICIÓN DE MEDIO DE CULTIVO PARA LEISHAMANIA

### MEDIO SCHNEIDER`S COMPLETO

<b>COMPONENTES</b>	<b>mL</b>
Schneider`s Drosophila Medium (Gibco®)	1000
Suero bovino fetal	200
Gentamicina	10